

# **Wirkungsmechanismus von zinnhaltigen Zahnpasten als Erosions- /Abrasionsinhibitoren**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Johanna Van Sanden

geb. Brinker

aus Gießen

Gießen 2016

Aus dem Medizinischen Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Leiter: Prof. Dr. B. Wöstmann

Gutachterin: Frau Prof. Dr. N. Schlüter  
Gutachter: PD Dr. Rehmann

Tag der Disputation: 13.02.2017

## Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
2 Material und Methoden .....	9
2.1 Auswahl der Proben .....	9
2.2 Probenherstellung.....	9
2.3 Versuchsgruppen.....	10
2.3.1 In vitro Studien .....	10
2.3.2 In situ Studien.....	12
2.4 Messmethoden .....	15
2.4.1 Bestimmung der Oberflächenrauigkeit.....	15
2.4.2 Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX) und Rasterelektronenmikroskopie .....	16
2.5 Statistik.....	22
3 Ergebnisse .....	27
3.1 Bestimmung der Oberflächenrauigkeit.....	27
3.2 Bestimmung des Zinngehaltes mit der EDX-Analyse .....	29
3.3 Qualitative Strukturanalyse .....	35
4 Diskussion.....	50
4.1 Versuchsaufbau.....	50
4.2 Messmethoden .....	52
4.3 Ergebnisse.....	54
4.3.1 Rauheitswerte .....	54
4.3.2 Zinnretention .....	58
4.3.3 Zinninkorporation.....	67
4.3.4 Strukturanalyse .....	68
4.4 Schlussfolgerung und Ausblick .....	71
5 Zusammenfassung.....	73
6 Summary.....	75

Literaturverzeichnis .....	77
Anhang.....	85

## 1 Einleitung

Erosionen sind Zahnhartsubstanzverluste, die durch vermehrten Kontakt von Säuren mit der Zahnoberfläche ohne Beteiligung von Mikroorganismen entstehen [Pindborg, 1970]. Diese Säuren können endogenen oder exogenen Ursprungs sein.

Exogene Säuren stammen meist aus Nahrungsmitteln. So führt der häufige Genuss von Zitrusfrüchten oder säurehaltigen Fruchtsaftgetränken und Limonaden zu einem sauren pH-Wert in der Mundhöhle und fördert so die erosive Demineralisation der Zahnhartsubstanz. Eine Studie zeigte beispielsweise ein erhöhtes Erosionsrisiko, wenn Zitrusfrüchte häufiger als zweimal pro Tag gegessen oder Softdrinks täglich getrunken werden [Järvinen et al., 1991]. Auch durch die Ausübung bestimmter Berufe können Säuren in die Mundhöhle gelangen [Wiegand und Attin, 2007].

Die endogene Ursache von Erosionen ist der Kontakt von Magensäure oder saurem Mageninhalt mit den Zähnen. Häufiges Erbrechen, zum Beispiel bei psychischen Erkrankungen wie Bulimia nervosa, gastro-ösophagealer Reflux und Regurgitation des Mageninhaltes können Ursachen dafür sein [Bartlett, 2006].

Erosionen zählen wie Abrasionen, Attritionen und Abfraktionen zu den nichtkariesbedingten Zahnhartsubstanzverlusten, unterscheiden sich jedoch von diesen in ihrer Ätiologie.

Abrasionen entstehen durch den Kontakt der Zähne mit einem zusätzlichen Medium. So können zum Beispiel Mundhygienemaßnahmen und gewohnheitsbedingtes Aufbeißen auf harte Gegenstände (Habits) ätiologische Faktoren darstellen. Attritionen bezeichnen den Zahnhartsubstanzverlust durch Kontakt von antagonistischen Zähnen, ohne Beteiligung eines weiteren Objektes. Abfraktionen stellen sich als keilförmiger Defekt im Zahnhalsbereich dar. Als Ursache wird eine funktionelle Überbelastung diskutiert [Rees et al., 2003] und die so geschwächte zervikale Region kann dann anfälliger für mechanisch-abrasive Vorgänge sein, so dass die Defekte weiter voranschreiten können [Lussi et al., 2011].

Erosionen entstehen durch die Einwirkung von Säuren, wenn das umgebende wässrige Milieu untersättigt ist in Bezug auf die im Zahn enthaltenden Mineralien [Larsen, 1990]. Für eine gewisse Zeit kann die Zahnoberfläche durch die Pellikel, welche aus Speichelbestandteilen besteht, geschützt werden [Hannig und Balz, 2001]. Kommt es zu einem Kontakt der Säure mit der Zahnoberfläche, werden dort durch Wasserstoffionen aus Säuren Mineralien wie Kalzium und Phosphat herausgelöst. Auch Chelatbildner, wie zum Beispiel Zitronensäure, sind in der Lage mit Kalziumionen

einen Komplex zu bilden, wodurch diese von der Kristalloberfläche entfernt werden können [Featherstone und Lussi, 2006].

Wirken Säuren über einen längeren Zeitraum ein, können Läsionen entstehen [Ganss, 2006]. Während bei einer kariösen Initialläsion die Zone der größten Demineralisation direkt unter der pseudointakten Oberfläche liegt, schreiten erosive Läsionen im Schmelz zentripetal voran und die Zone der größten Demineralisation liegt peripher [Lussi et al., 2011].

Im Dentin beginnt die Läsion im peritubulären Dentin, bei weiterem Voranschreiten sind auch die intertubulären Bereiche betroffen, wobei eine raue und poröse Oberfläche entsteht und die Dentintubuli erweitert werden [Meurman et al., 1991]. Wenn die anorganischen Bestandteile herausgelöst werden, bleibt zumindest unter in vitro Bedingungen die organische Dentinmatrix bestehen und behindert die Diffusion der Säuren. Je dicker die entmineralisierte organische Matrix wird, desto langsamer schreitet die Demineralisation voran [Ganss et al., 2004].

Klinisch ist eine beginnende erosive Läsion nur schwer zu erkennen. Zunächst zeigt sich eine matt glänzende Oberfläche mit veränderter Schmelzstruktur, wobei auch schon bei Jugendlichen in diesem Bereich die Perikymatien fehlen [Lussi und Jaeggi, 2008]. An den Glattflächen entstehen bei weiterem Voranschreiten koronal der Schmelz-Zement-Grenze flächige Konkavitäten, wobei ein zervikales Schmelzband meist intakt bleibt [Ganss und Lussi, 2006]. Dies ist darauf zurückzuführen, dass sich dort meist ein Plaquesaum befindet, welcher die Säureeinwirkung auf den Zahn verringert. Zudem übt die Sulkusflüssigkeit eine neutralisierende Wirkung auf erosive Flüssigkeiten aus [Lussi et al., 2004]. Die Läsionen sind in ihrer Ausdehnung wesentlich breiter als tief, wodurch sie sich von keilförmigen Defekten unterscheiden, die in ihrer Tiefenausdehnung größer sind als in ihrer Breitenausdehnung.

Okklusal kommt es zunächst zu muldenförmigen Vertiefungen an den Höckerspitzen, die bei einem weiteren Voranschreiten zu einem Verlust des gesamten Höcker-Fissuren-Reliefs führen können. Füllungen können über das Niveau der umliegenden Zahnhartsubstanz hinausragen [Ganss und Lussi, 2006].

Zur Bestimmung des Schweregrades von Erosionen und Beurteilung der Behandlungsbedürftigkeit wurde ein internationaler Index, die sogenannte Basic Erosive Wear Examination (BEWE) eingeführt. Jedem Schweregrad wurden Therapieempfehlungen zugeordnet.

Zur Erhebung des BEWE-Index wird sextantenweise die Ausprägung der Erosionen an Glattflächen beziehungsweise Okklusalflächen beurteilt. Dafür wird ein vierstufiges Bewertungsschema genutzt (Tab.1).

Tabelle 1: Einteilung zur Bewertung des Schweregrades der erosiven Destruktion [Bartlett et al., 2008]

Score	Bewertungskriterien
0	Keine Erosionen
1	Initialer Verlust der Oberflächenstrukturen (z. B. Glanz, Perikymatien)
2 (oft mit Dentinbeteiligung)	Klinisch manifester Defekt Zahnhartsubstanzverlust auf weniger als 50 % der Zahnoberfläche
3 (oft mit Dentinbeteiligung)	Klinisch manifester Defekt Zahnhartsubstanzverlust auf 50 % oder mehr der Zahnoberfläche

Es werden alle Zähne untersucht und der jeweils höchste Wert eines Sextanten erfasst. Aus diesen Einzelwerten wird ein Summenwert gebildet welcher maximal 18 Punkte betragen kann. Der Summenwert wurde in vier Kategorien eingeteilt, wobei jeder Kategorie kausale und symptomatische Therapieempfehlungen zugeordnet sind. Liegt ein Wert von kleiner oder gleich 2 vor, besteht kein Handlungsbedarf. Bei einem Wert zwischen 3 und 8 werden erosionsbezogene Ernährungsempfehlungen ausgesprochen. Liegt der Wert zwischen 9 und 13 werden die Ursachen der Erosionen gesucht sowie kausale und symptomatische Therapien empfohlen. Bei einem Summenwert ab 14 sollten auch restaurative Therapiemaßnahmen in Betracht gezogen werden [Bartlett et al., 2008].

Als Therapiemaßnahmen können kausale von symptomatischen Ansätzen unterschieden werden. Die kausale Therapie besteht zum einen in einer Herabsetzung der Säureexposition. Zum anderen soll, zum Beispiel durch Zugabe von Mineralien, eine Reduzierung oder vollständige Eliminierung der Untersättigung an Mineralien der Säure in Bezug auf die Zahnhartsubstanz erreicht werden. Die Verweildauer der sauren Speisen und Getränke im Mund sollte möglichst kurz gehalten werden. Der gleichzeitige Konsum von Milchprodukten mit säurehaltigen Nahrungsmitteln kann die Wirkung der Säuren abschwächen [Lussi et al., 2004]. Durch den Zusatz von Mineralien wie Kalzium kann die Erosivität von Getränken herabgesetzt werden. In einer Studie konnte der Zusatz von Kalzium und Phosphat zu Orangensaft mit einem niedrigen pH-Wert von etwa 4 das erosive Potential des Getränks herabsetzen. Verglichen mit dem gleichen Orangensaft ohne Zusatz der Mineralien zeigte der

Orangensaft mit Kalzium- und Phosphatzusatz einen signifikant niedrigeren Schmelzverlust [Larsen und Nyvad, 1999].

Wenn eine kausale Therapie nicht möglich ist, weil die Säure nicht eliminiert werden kann, wird eine symptomatische Therapie angestrebt.

Die Ziele einer symptomatischen Therapie sind die Verringerung der erosiven Demineralisation und die Erhöhung der Säureresistenz der bestehenden Zahnhartsubstanz. Hierzu können fluoridhaltige Produkte eingesetzt werden. Herkömmliche Fluoridverbindungen wie Aminfluorid und Natriumfluorid sind in der Lage, eine kalziumfluoridähnliche Deckschicht auf der Zahnoberfläche zu bilden [Caslavska et al., 1975]. Diese Deckschicht kann nur von sauren Produkten ausgebildet werden, wobei die Dicke mit sinkendem pH-Wert, steigender Fluoridkonzentration und zunehmender Einwirkzeit zunimmt [Saxegaard und Rolla, 1988]. Die Schicht kann kurzfristig die Zahnhartsubstanz wirksam vor erosiver Demineralisation schützen. Nachteilig an der kalziumfluoridähnlichen Deckschicht ist jedoch, dass sie wenig säure- [Ganss et al., 2007b] und abrasionsstabil ist [Wegehaupt et al., 2009]. Unter Mundbedingungen müsste bei Verwendung der herkömmlichen Fluoridprodukte die Deckschicht durch häufige Applikation und lange Einwirkzeiten immer wieder erneuert werden. Dies wäre sehr zeit- und kostenintensiv und häufig nicht mit dem Alltag vereinbar.

In neueren Studien konnte die hohe Wirksamkeit von Fluoridverbindungen gezeigt werden, die polyvalente Metallkationen enthalten. Dazu gehört zum Beispiel Titantetrafluorid ( $\text{TiF}_4$ ). Das Auftragen von  $\text{TiF}_4$  auf die Zahnhartsubstanz führte bei niedrigem pH-Wert (1,2) zur Ablagerung von säureresistenten titanhaltigen Präzipitaten [Wiegand et al., 2009]. Diese bilden eine glasurähnliche Schicht auf der Zahnoberfläche, die gegen Säuren resistenter ist als die kalziumfluoridähnliche Deckschicht [Schlueter et al., 2007; Hove et al., 2007; Hooper et al., 2007].

Als noch effektiver stellten sich in diesem Zusammenhang saure Zinnfluoridverbindungen dar. In Form von Mundspüllösungen konnten sie auch nach kurzer Applikationsdauer und unter sehr sauren Bedingungen sowohl unter in vitro als auch unter in situ Bedingungen einen erosiven Zahnhartsubstanzverlust reduzieren [Schlueter et al., 2009d; Schlueter et al., 2009c]. Eine in vitro Studie untersuchte Schmelzproben, die nach zyklischer De- und Remineralisation mit zinn- und fluoridhaltigen Lösungen behandelt wurden. Alle Testlösungen enthielten Aminfluorid und NaF (jeweils 750 ppm  $\text{F}^-$ ) sowie  $\text{SnCl}_2$  mit unterschiedlichem Zinngehalt (2100 ppm, 1400 ppm, 400ppm  $\text{Sn}^{2+}$ ). Es wurde ein möglicher Substanzverlust gemessen und anschließend mittels energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX) die



Ablagerung von Zinn auf der Oberfläche sowie der Einbau von Zinn in tiefere Schichten untersucht. Zusätzlich sollten mit dem Rasterelektronenmikroskop mögliche strukturelle Veränderungen dargestellt werden. Aus der Behandlung mit den Testlösungen resultierte eine signifikante Reduzierung des Substanzverlustes, verglichen mit einer Kontrollgruppe. Mit EDX konnte eine Ablagerung von Zinn auf der Oberfläche nachgewiesen werden, wobei die Menge an Zinn auf der Oberfläche (mittelwertig 18,3 wt%, 14,5 wt%, 6,1 wt%) mit dem Zinngehalt der Testlösung abnahm. Auch eine Inkorporation des Zinnions in die äußeren Schichten der Zahnhartsubstanz konnte gezeigt werden. Nach Verwendung der beiden höher konzentrierten Lösungen konnten Zinnionen bis zu einer Tiefe von 20 µm, nach Verwendung der niedrig konzentrierten Lösung bis zu einer Tiefe von 10 µm nachgewiesen werden. Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Querschnitte stellte eine strukturell modifizierte Zone dar, deren Dicke für den hohen und den mittleren Zinngehalt gleich, für den niedrigen Zinngehalt geringer war.

Bei den Proben, die mit den Testlösungen behandelt wurden, jedoch keiner zyklischen Demineralisation ausgesetzt waren, zeigte sich keine strukturell veränderte Zone im Querschnitt. Die Oberfläche der Proben zeigte amorphe Präzipitate mit einer Dicke von 500 nm, wobei diese zwischen den Gruppen nicht variierte [Schlueter et al., 2009b].

Auch in einer in situ Studie konnte die antierosive Wirksamkeit zinnhaltiger Lösungen, allerdings mit einer anderen Zusammensetzung, gezeigt werden. So verringerte eine AmF/NaF/SnCl<sub>2</sub>-haltige Mundspüllösung den erosiven Substanzverlust signifikant um 67%, während eine NaF-haltige Lösung zu einer Substanzverlustreduzierung von 19% verglichen mit der Placebolösung führte [Ganss et al., 2010].

Neben einem räumlichen Substanzverlust resultiert aus der erosiven Demineralisation eine signifikante Abnahme der Mikrohärtigkeit [Lussi et al., 1997; Maupome et al., 1998] und somit eine höhere Anfälligkeit für mechanische Noxen [Attin et al., 1997]. Daher kann nach einem Säurekontakt, zusätzlich zu dem säurebedingten Substanzverlust, durch das Bürsten und die Verwendung von Zahnpasten Zahnhartsubstanz abgetragen werden.

Frühere Empfehlungen, zwischen Säureexposition und Zähneputzen eine Wartezeit von ein bis zwei Stunden einzuhalten, um so den abrasiven Substanzverlust zu verringern, werden heute nicht mehr ausgesprochen. Die Basis dieser Empfehlungen beruhte auf der Annahme, dass Mineralien aus dem Speichel ausfallen und die Zahnoberfläche wieder erhärten würden. In einer in situ Studie konnte jedoch keine Verringerung des erosiv/abrasiven Zahnhartsubstanzverlustes nach einer Wartezeit von zwei Stunden gezeigt werden [Ganss et al., 2007a]. Eine weitere in situ Studie

konnte nach einer 10 minütigen Säureexposition und einer Remineralisierungsphase von bis zu drei Tagen in der Mundhöhle ebenfalls keine signifikante Erhärtung der Zahnoberfläche zeigen [Lippert et al., 2004]. Zudem sind Wartezeiten von ein bis zwei Stunden im Alltag oft nicht realisierbar. Sinnvoller in diesem Zusammenhang erwiesen sich Versuche, eine organische Schutzschicht auf der Zahnoberfläche zu bilden [Cheaib und Lussi, 2011] oder die Säurelöslichkeit der kristallinen Struktur der Zahnhartsubstanz zu verringern [Schlueter et al., 2010; Schlueter et al., 2009a]. Letzteres konnte durch den Einsatz von Fluoridverbindungen mit polyvalenten Metallkationen wie zum Beispiel Zinnionen für Mundspüllösungen bereits gezeigt werden [Schlueter et al., 2010; Schlueter et al., 2009a].

Neuere Studien zeigen, dass auch Zahnpasten durch die Zugabe von Zinnfluorid vielversprechende Ergebnisse erzielen konnten. So wurde nach Verwendung zweier zinnfluoridhaltiger Zahnpasten in einer in situ Studie der erosiv bedingte Substanzverlust signifikant um 26%, beziehungsweise 34% reduziert. Verglichen mit einer herkömmlichen NaF-haltigen Paste (7% Reduktion) zeigten die zinnfluoridhaltigen Zahnpasten somit eine bessere Wirksamkeit [Huysmans et al., 2011]. In einer in vitro Studie konnten zwei zinnfluoridhaltige Produkte den erosiv bedingten Substanzverlust ebenfalls signifikant reduzieren. Dabei wurde jedoch der Substanzverlust durch das zusätzliche Bürsten der Proben auf das Niveau einer herkömmlichen NaF-haltigen Zahnpaste reduziert. Wobei zu beachten ist, dass nicht das Bürsten an sich, sondern die Anwesenheit von Abrasiva in der Pasten zu einem höheren erosiv/abrasiv bedingten Substanzverlust führt [Ganss et al., 2011; Huysmans et al., 2011].

Neuere Ansätze verfolgen daher das Ziel, zum Beispiel durch Zugabe von Biopolymeren, auch den erosiv/abrasiv bedingten Zahnhartsubstanzverlust zu verringern.

Chitosan ist ein natürlich vorkommendes Biopolymer und entsteht durch die Deacetylierung von Chitin. Das kationische Polyelektrolyt hat bei niedrigem pH-Wert eine stark positive Ladung und kann dadurch an negative Oberflächen, wie zum Beispiel dem Schmelz, binden [Claesson und Ninham, 1992]. Chitosan zeigt einen hemmenden Einfluss auf Demineralisationsvorgänge bei der Kariesentstehung im Schmelz sowohl in vitro [Arnaud et al., 2010] als auch in situ [Uysal et al., 2011]. Daher könnte Chitosan als Zusatzstoff auch die anti-erosive und anti-erosiv/abrasive Wirksamkeit spezieller Zahnpasten verbessern.

Bisher konnte die Wirksamkeit von Chitosan in zwei in vitro und in zwei in situ Studien gezeigt werden. So reduzierte, im Vergleich mit einer fluoridfreien Kontrollzahnpaste,

eine chitosanhaltige fluoridfreie Zahnpaste unter in vitro Bedingungen einen erosiv/abrasiven Substanzverlust des Schmelzes um etwa 25%. Dies entspricht der Wirksamkeit herkömmlicher NaF-haltiger Zahnpasten [Ganss et al., 2011]. In einer weiteren Studie konnte durch die Zugabe von Chitosan zu einer zinn- und fluoridhaltigen Zahnpaste deren anti-erosiv/abrasive Wirksamkeit signifikant erhöht werden [Ganss et al., 2012].

Die Wirksamkeit einer F/Sn/Chitosan-Zahnpaste unter in vitro Bedingungen ist also erwiesen. Ebenso gibt es vielversprechende Hinweise auf die Effektivität unter in situ Bedingungen. Zwei in situ Studien, aus denen die Proben der vorliegenden Arbeit stammen, konnten eine gute Wirksamkeit der F/Sn/Chitosan-Zahnpaste zeigen. Nach Behandlung mit dem jeweiligen Zahnpastengemisch betrug die Reduktion des Substanzverlustes verglichen mit einer Placebopaste für F/Sn 68%, für F/Sn/Chitosan 76% und für GelKam, ein zinn- und fluoridhaltiges Gel, 82%. Wurden die Proben zusätzlich noch gebürstet, war die Reduktion des Substanzverlustes geringer. Es zeigten sich Werte von 27% für F/Sn, 46% für F/Sn/Chitosan und 69% für GelKam, verglichen mit einer Placebopaste [Schlueter et al., 2013a].

Der Wirkungsmechanismus für die Effektivität von Mundspüllösungen ist für in vitro Bedingungen untersucht worden [Schlueter et al., 2009b]. Für Zahnpasten wurden jedoch für in vitro Bedingungen sowohl unter erosiven als auch unter erosiv/abrasiven Bedingungen bisher keine Studien zur Aufdeckung des Wirkungsmechanismus durchgeführt. Wahrscheinlich liegt für Zahnpasten ein anderer Wirkungsmechanismus vor. So ist die Zusammensetzung der Pasten im Vergleich zu Spüllösungen komplexer und der Gehalt der Wirkstoffe niedriger. Zahnpasten enthalten außer den Wirkstoffen noch Zusätze wie zum Beispiel Konservierungsmittel, Tenside, Bindemittel und Feuchthaltemittel. Es wurde gezeigt, dass die Verfügbarkeit der Wirkstoffe, zum Beispiel von Zinn, durch die enthaltenen Zusatzstoffe eingeschränkt ist [Schlueter et al., 2013a]. Zudem enthalten Zahnpasten Abrasivstoffe, welche durch das mechanische Auftragen der Pasten mit Bürsten zu einem zusätzlich abrasiven Einfluss führen und somit die Ergebnisse beeinflussen.

Unter in situ Bedingungen ist der Reaktionsmechanismus noch völlig ungeklärt, sowohl für Zahnpasten als auch für Mundspüllösungen. Dies liegt an dem Einfluss verschiedener intraoraler Faktoren. Dabei ist vor allem die Rolle des Speichels und der Pellikel relevant. Organische Bestandteile der Pellikel wie beispielsweise Statherin, Histatin, Muzine und Albumin können dabei Einfluss auf die Reaktionsmechanismen nehmen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, den Wirkungsmechanismus einer AmF-NaF- und SnCl<sub>2</sub>-haltigen Zahnpaste mit beziehungsweise ohne Chitosanzusatz im Schmelz zu untersuchen. Das erfolgte an Proben vorangegangener Studien, die sowohl unter in vitro als auch unter in situ Bedingungen behandelt wurden, um mögliche Unterschiede in der Wirkungsweise aufdecken zu können. Zudem wurden die Proben unter in situ Bedingungen sowohl rein erosiven als auch erosiv/abrasiven Einflüssen ausgesetzt, um den Reaktionsmechanismus zwischen der Zahnhartsubstanz und den Wirkstoffen der Zahnpasten unter beiden Bedingungen zu vergleichen. Die Proben der in vitro Studie wurden alle erosiv/abrasiv behandelt. In der vorliegenden Arbeit sollte die Ablagerung von Zinn auf der Schmelzoberfläche sowie die Inkorporation von Zinn in tiefere Schichten des Zahnschmelzes untersucht werden. Zusätzlich wurden morphologische Strukturveränderungen der Zahnoberfläche untersucht. Hierzu wurde zunächst die Oberflächenrauigkeit bestimmt und anschließend wurden mit einem Rasterelektronenmikroskop sowohl eine quantitative Elementanalyse durchgeführt als auch die Oberflächenstruktur der Schmelzproben qualitativ untersucht.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Auswahl der Proben**

Für die Versuchsdurchführung wurden Proben aus bereits abgeschlossenen Versuchen anderer Studien verwendet [Ganss et al., 2012; Schlueter et al., 2013a; Schlueter et al., 2013b]. Die Proben stammten aus zwei in vitro sowie zwei in situ Studien (in situ Studien genehmigt durch die Ethik-Kommission des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, Antragsnummern 46/10 und 05/11). Die weitere Verwendung der Proben der in situ Studien wurde ebenfalls durch die Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen genehmigt (Amendments zu den Anträgen 46/10 und 05/11).

### **2.2 Probenherstellung**

Das Verfahren zur Herstellung der Proben war für die in vitro und in situ Studien gleich und soll im Folgenden gemeinsam beschrieben werden. Die Herstellung und Behandlung der Proben erfolgte nicht im Rahmen der vorliegenden Dissertation, soll jedoch zum besseren Verständnis hier erläutert werden.

Für die Gewinnung der Schmelzproben wurden ausschließlich dritte Molaren verwendet, die bis zu ihrer Entfernung vollständig impaktiert waren. Alle Spender leben in einem Gebiet mit  $\leq 0,03$  ppm Fluorid im Trinkwasser. Die Zähne wurden zur Desinfektion und Konservierung in einer gesättigten wässrigen Thymollösung (Chem. 1) gelagert; vor ihrer Verwendung wurden anhaftende Gewebereste entfernt. Zur Herstellung der Proben wurden die Wurzeln mit einer diamantierten Bandsäge (Mat. 2) an der Schmelz-Zementgrenze abgetrennt, von den verbliebenen Zahnkronen wurde der äußere Schmelzmantel verwendet. Pro Zahn konnten jeweils vier longitudinale Schmelzschnitte von etwa 1 mm Dicke gewonnen werden. Von den Schmelzproben wurden von ihrer natürlichen äußeren Oberfläche mit Diamantschleifscheiben der Körnung 30 und 15  $\mu\text{m}$  (Mat. 3) etwa 250 bis 300  $\mu\text{m}$  Substanz abgetragen. Die Proben wurden plangeschliffen (Mat. 4) um ein Versuchsfeld von mindestens 3 mm x 3 mm zu erzeugen. Anschließend erfolgte eine Politur des Versuchsfeldes mit einer Diamantschleifscheibe der Körnung 3  $\mu\text{m}$  (Mat. 3). Alle Trenn- und Schleifvorgänge erfolgten unter ausreichender Wasserkühlung (ca. 50 ml/min). Bis zu ihrer weiteren Verwendung wurden die Proben bei 100% Luftfeuchtigkeit im Kühlschrank aufbewahrt.

## **2.3 Versuchsgruppen**

### **2.3.1 In vitro Studien**

#### **2.3.1.1 Versuchslösungen und untersuchte Produkte der in vitro Studie**

##### **Demineralisationslösung**

Bei allen Gruppen wurde eine erosive Demineralisation mit 0,5%iger Zitronensäure (pH 2,6) (Chem. 2) durchgeführt. Dazu wurden 5 g Zitronensäure-Monohydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 1000 ml destilliertem Wasser (Aqua dest.) gelöst. Der pH-Wert wurde morgens und abends mit einer ionenselektiven Elektrode (Mat. 6) überprüft.

##### **Remineralisationslösung**

Für die Remineralisationslösung wurden 0,4 g  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (Chem. 3) in 40 ml Aqua dest., 1,5 g KCl (Chem. 4) in 100 ml Aqua dest. und 1 g  $\text{NaHCO}_3$  (Chem. 5) in 100 ml Aqua dest. gelöst. Nachdem diese Lösungen zusammengegeben und auf 600 ml aufgefüllt wurden, wurde 0,2 g  $\text{CaCl}_2$  (Chem. 6) in 100 ml Aqua dest. gelöst und unter Rühren hinzugefügt. Die angesetzte Lösung wurde auf 1 L Volumen aufgefüllt. Der pH-Wert der Lösung betrug 6,7.

Aus zwei in vitro Studien wurden Proben verwendet, die insgesamt mit vier experimentellen Zahnpasten, einschließlich einer Placebopaste, und einem Marktprodukt (GelKam) behandelt wurden. Eine der beiden Studien hatte das Ziel, die Wirkung einer experimentellen NaF Zahnpaste und einer Zahnpaste mit AmF/NaF/ $\text{SnCl}_2$ /Chitosan im Vergleich zu einem Marktprodukt in Bezug auf den erosiv/abrasiv bedingten Zahnhartsubstanzverlust im Schmelz darzustellen.

Aus der anderen in vitro Studie, welche dem gleichen Protokoll wie die hier aufgeführten Studie folgte, wurden Proben verwendet, welche mit der oben genannten experimentellen AmF/NaF/ $\text{SnCl}_2$  Paste, allerdings ohne Chitosan behandelt wurden.

Tabelle 2: Verwendete Zahnpasten der in vitro Studie

Zahnpaste	Wirkstoffe	pH-Wert
F/Sn	3500 ppm Sn als $\text{SnCl}_2$ ,	4,4
	700 ppm F als NaF,	
	700 ppm F als AmF	
F/Sn/Chitosan	3500 ppm Sn als $\text{SnCl}_2$ ,	4,4
	700 ppm F als NaF,	
	700 ppm F als AmF,	
	0,5% Chitosan	
GelKam	1000 ppm F und 3000 ppm Sn als $\text{SnF}_2$	4,0
	Keine Abrasiva	
NaF	1400 ppm F als NaF	4,7
Placebo	Keine Wirkstoffe	6,4

Aus den Testprodukten wurden täglich mit einer Remineralisationslösung im Verhältnis 1:3 (nach Gewicht) Zahnpastensuspensionen zubereitet. Der pH-Wert der Zahnpastensuspensionen wurde zu Versuchsbeginn bestimmt.

### 2.3.1.2 Versuchsablauf der in vitro Studien

Der in vitro Versuch wurde über einen Zeitraum von 10 Tagen (2x fünf Wochentage) durchgeführt. Alle verwendeten Lösungen wurden jeden Tag erneuert und vor Versuchsbeginn in die dafür vorgesehenen Behälter eingefüllt. Die Proben wurden mit lichthärtendem Kunststoff (Mat. 1) auf Probenträger für einen Bürstsimulator (Mat. 5) geklebt. Die Hälfte der Probenoberfläche wurde mit lichthärtendem Kunststoff abgedeckt, um eine Referenzfläche zu erhalten. Die freie Oberfläche (Versuchsfläche) wurde sorgfältig auf Verunreinigungen und Kunststoffreste kontrolliert. Die Probenträger wurden in Halterungen eingebracht, um das gleichzeitige Durchführen von De- und Remineralisationsvorgängen aller Proben einer Gruppe zu ermöglichen. Die erosive Demineralisation erfolgte im Abstand von einer Stunde 6-mal täglich. Die Zeiten wurden mit einer digitalen Stoppuhr (Mat. 6) gemessen und genau eingehalten. Alle Proben wurden täglich 6 x 2 Minuten in 250 ml der Zitronensäure geschwenkt (Frequenz: 35 pro min, Mat. 8) und anschließend für 30 Sekunden unter fließendem Wasser abgespült. Zweimal täglich, nach der ersten und letzten Demineralisation eines

Tages, wurden die Proben für zwei Minuten mit der entsprechenden Zahnpastensuspension behandelt und währenddessen für 15 Sekunden im Bürstsimulator (ADA Referenzzahnbürste; Verfahrenweg 6, Geschwindigkeit 60, Druck 200 g, Zickzack-Modus; Mat. 5) gebürstet. Die Probenträger wurden beim zweiten Bürstvorgang eines Tages um 180 Grad gedreht eingesetzt, um ein eventuell unterschiedliches Einwirken der Bürsten auszuschließen. Nach jedem Bürstvorgang wurden die Proben eine Minute unter fließendem Wasser abgespült, bis makroskopisch keine Zahnpastenreste mehr zu erkennen waren, und in die Remineralisationslösung zurückgesetzt. Das Bürsten und die Demineralisation erfolgten bei Raumtemperatur. Die Temperatur der Remineralisationslösung wurde bei 25 Grad konstant gehalten. Am Wochenende wurden die Proben in einer feuchten Kammer bei 100% Luftfeuchtigkeit im Kühlschrank aufbewahrt.

Nach dem 10. Versuchstag wurden die Abdeckungen der Referenzflächen aller Proben entfernt. Bis zur Auswertung wurden die Proben in einer feuchten Kammer im Kühlschrank aufbewahrt.

### **2.3.2 In situ Studien**

#### **2.3.2.1 Versuchslösungen und untersuchte Produkte der in situ Studien**

##### **Demineralisationslösung**

Die Proben aller Gruppen wurden, wie in der in vitro Studie, mit 0,5%iger Zitronensäure (Chem. 2) erosiv demineralisiert.

In den in situ Studien wurde die Wirkung experimenteller AmF/NaF/SnCl<sub>2</sub>-haltiger Zahnpasten mit beziehungsweise ohne Chitosan im Vergleich zu einer reinen NaF-Paste, einer Placebo Paste und einem kommerziellen Produkt (GelKam) in Bezug auf den erosiv bedingten Zahnhartsubstanzverlust im Schmelz untersucht.



Es wurden folgende Produkte verwendet:

Tabelle 3: Zusammensetzungen und pH-Werte der verwendete Pasten der in situ Studien, Bezeichnung der Zahnpaste entspricht dem Gruppennamen

Zahnpaste	Wirkstoffe	pH-Wert
F/Sn	3500 ppm Sn als $\text{SnCl}_2$ , 700 ppm F als NaF, 700 ppm als AmF	4,4
F/Sn/Chitosan	3500 ppm Sn als $\text{SnCl}_2$ , 700 ppm F als NaF, 700 ppm F als AmF, 0,5% Chitosan	4,4
GelKam	1000 ppm F und 3000 ppm Sn als $\text{SnF}_2$	4,0
NaF	Keine Abrasiva 1400 ppm F als NaF	4,7
Placebo	Keine Wirkstoffe	6,4

### 2.3.2.2 Versuchsablauf der in situ Studien

Die in situ Studien wurden als doppelblinde, prospektive, *cross over* Studien nach den Richtlinien der Good Clinical Practice (GCP) und der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Sie wurden in der Poliklinik für Zahnerhaltungskunde der Zahnklinik der Universität Gießen durchgeführt, wo ein leitender Untersucher für das korrekte Einhalten des Studienprotokolls verantwortlich war; zwei Untersucher führten die klinischen und technischen Aufgaben durch. Die Studie wurde durch einen externen Monitor überwacht. Es nahmen 10 bzw. 27 Probanden an den Studien teil. Die Einschlusskriterien waren Volljährigkeit, keine schweren Erkrankungen, vor allem keine, die die Speichelfließrate beeinflussen, das schriftliche Einverständnis zur Teilnahme an der Studie, kein herausnehmbarer Zahnersatz, keine kieferorthopädischen Apparaturen, gesundes oder suffizient restauriertes Gebiss, keine sichtbare Plaque, keine klinisch sichtbaren Anzeichen von Speicheldrüsenunterfunktion. Ausschlusskriterien waren bekannte Allergien gegen Mundhygieneprodukte und/oder orale Therapeutika und/oder dentale Materialien, Einnahme von Medikamenten, welche die Speichelfließrate beeinflussen, sowie Schwangerschaft oder Stillen.

Die Probanden wurden nach der Auswahl mündlich über Ziel und Durchführung der Studie informiert und erhielten schriftliche Anweisungen sowie das Formblatt zur schriftlichen Einverständniserklärung.

Für die in situ Versuche wurden je 6 Schmelzproben auf der bukkalen Seite eines aus Acrylat gefertigten intraoralen Probenhalters für den Oberkiefer befestigt. Die Hälfte der Probenoberfläche wurde mit lichthärtendem Kunststoff abgedeckt, um eine Referenzfläche zu erhalten. Die freie Oberfläche (Versuchsfläche) wurde sorgfältig auf Verunreinigungen und Kunststoffreste kontrolliert. Vor dem Einsetzen in den Mund wurden die Proben für 30 Minuten zur Desinfektion in Ethanol (Chem. 7) gegeben. Die Versuchszeit wurde in Perioden mit jeweils 7 Versuchstagen pro Zahnpaste aufgeteilt. Vor jeder experimentellen Periode wurde eine 5-tägige wash-out Phase eingehalten. Während der Versuchszeit sollten Speisen und Getränke mit hohem Fluoridgehalt (Tee, Seefisch, Mineralwasser, fluoridiertes Salz) vermieden werden. Die Mundhygiene erfolgte mit der Placebo Zahnpaste und einer standardisierten Zahnbürste (Mat. 9) ohne die experimentelle Apparatur. Außer den zur Verfügung gestellten Produkten durften keine weiteren Mundhygieneprodukte verwendet werden.

Die Proben wurden Tag und Nacht getragen, außer während den Mahlzeiten. Nach jeder Mahlzeit wurden 15 Minuten gewartet und die Probenträger erst dann wieder in den Mund eingesetzt. Für die erosive Demineralisation wurden die Proben 6 x 2 Minuten pro Tag außerhalb des Mundes in 200 ml der Zitronensäure geschwenkt (Schüttelfrequenz 30/min; Raumtemperatur). Zwischen den Phasen der Demineralisation lagen jeweils 1,5 Stunden. Nach der Demineralisation wurden die Proben für 1 Minute unter Leitungswasser abgespült. Nach der ersten und letzten Demineralisation eines Tages wurde mit einer erbsengroßen Menge der jeweiligen Zahnpasta und einer elektrischen Zahnbürste mit Druckalarm, der bei 2,5 N auslöst (Mat. 10), gebürstet. Zuerst wurde okklusal an den eigenen Zähnen für 15 Sekunden gebürstet, um eine Zahnpasten-Speichel-Suspension zu produzieren. Anschließend wurden die Schmelzproben für 5 Sekunden mit einem Druck von 2,5 N gebürstet. Das Speichel/Zahnpasta-Gemisch wurde inklusive der Putzzeit 2 Minuten im Mund behalten. Anschließend wurde der Mund für 3 Sekunden mit Leitungswasser gespült, der Probenhalter aus dem Mund entnommen und die Proben dann für eine Minute unter Leitungswasser abgespült, um alle Zahnpastenreste zu entfernen. Die Proben auf der linken Seite (für Linkshänder auf der rechten Seite) der Apparatur wurden demineralisiert, mit der Zahnpastensuspension behandelt und gebürstet, die auf der rechten Seite (für Linkshänder auf der linken Seite) nur demineralisiert und mit der Suspension behandelt. Am Abend jedes Versuchstages wurde die Apparatur für eine Minute in eine Chlorhexidindigluconatlösung (Chem. 8) getaucht, um eine

Plaquesammlung an den ungebürsteten Proben zu vermeiden. Die Probenträger, nicht aber die Proben wurden mechanisch mit einer Bürste ohne Zahnpaste gereinigt. Die Probanden wurden umfangreich auf den Ablauf vorbereitet und erhielten schriftliche Anweisungen sowie einen Plan des Ablaufes mit Kontrolllisten für die Dokumentation. Alle Zeiten wurden mit einer Stoppuhr (Mat. 6) kontrolliert. Die Einhaltung der Demineralisations- und Putzzeiten sowie der Zahnpastenphasen wurde von den Untersuchern anhand des von den Probanden ausgefüllten Ablaufplanes kontrolliert.

### **2.4 Messmethoden**

Im Folgenden wird beschrieben, wie sowohl Proben aus den vorhergegangenen Studien als auch für die vorliegende Arbeit neu angefertigte Proben für die vorliegende Dissertation nachuntersucht wurden.

#### **2.4.1 Bestimmung der Oberflächenrauigkeit**

Zur Untersuchung der Oberflächenbeschaffenheit wurde ein optisches Messgerät (Mat. 11) verwendet. Dessen Messprinzip beruht auf der chromatischen Abstandsmessung. Hierzu wird weißes Licht mittels einer Optik mit ausgeprägter chromatischer Aberration aus einer Hochleistungs-LED auf die Probenoberfläche gestrahlt. Für die Wellenlänge, für die sich die Oberfläche im Fokus befindet, wird das Licht maximal reflektiert. Anhand des an der Probenoberfläche reflektierten Spektrums des gestreuten Lichts zeigt sich ein Peak, aus dessen spektraler Position die Oberflächenbeschaffenheit errechnet werden und Informationen über Höhe, Rauheit bzw. Profil gewonnen werden.

Es wurde eine Messfeldgröße von 0,4 mm x 0,4 mm (200 x 200 Bildpunkte) festgelegt, um ein ausreichend repräsentatives Areal zu messen. Die Intensität wurde bei 100 Hz konstant gehalten. Die vertikale Auflösung betrug 10 nm, die laterale Auflösung 1-2 µm.

Zur Darstellung der Oberflächengeometrie wurden als Parameter Ra (arithmetischer Mittelwert der Profilabweichung von der Mittellinie = arithmetischer Mittenrauwert) und Rz (arithmetische Mittel aus den Einzelrautiefen von fünf äquidistanten aneinandergrenzenden Einzelmessstrecken = gemittelte Rautiefe) gewählt und mit dem Softwarepaket Mark III (Mat. 12) ausgewertet.

Aus der in vitro Studie wurden von den Gruppen F/Sn/Chitosan, GelKam, NaF und Placebo jeweils 15 Proben untersucht (n = 60).

Von einem anderen Doktoranden (Matthias Jung) erfolgte analog die Untersuchung von 15 Proben der Paste F/Sn. Die gewonnenen Daten wurden in der vorliegenden Arbeit zum Vergleich herangezogen.

Aus den in situ Studien wurden jeweils 30 Proben (je 15 gebürstete und 15 ungebürstete Proben) der Gruppen F/Sn, F/Sn/Chitosan, GelKam, NaF und Placebo untersucht (n = 150).

### **2.4.2      Energiedispersive      Röntgenspektroskopie      (EDX)      und Rasterelektronenmikroskopie**

In einem Rasterelektronenmikroskop wird durch einen Wolframdraht oder einen LaB<sub>6</sub>-Kristall als Elektronenquelle ein Elektronenstrahl erzeugt, welcher die Probenoberfläche abfährt. Dazu wird der Elektronenstrahl mit einer Magnetspule fokussiert. Um Wechselwirkungen mit Atomen und Molekülen der Luft zu vermeiden, findet dieser Prozess im Regelfall unter einem Hochvakuum statt. Die Elektronen treffen auf das Objekt und die dort stattfindenden Wechselwirkungen werden zur Bilderzeugung genutzt. Die Primärelektronen, die durch den Strahl auf die Objektoberfläche treffen, erzeugen dort eine Sekundärelektronenemission. Diese Sekundärelektronen (SE) können von einem SE-Detektor erfasst und zur Bilderzeugung genutzt werden. Sie haben eine Energie von wenigen eV und bilden die oberflächlichste Schicht eines Objektes ab. Über diese Sekundärelektronen kann somit die Topographie der betrachteten Oberfläche dargestellt werden.

Ein Materialkontrastbild kann anhand der von der Objektoberfläche zurückgestreuten Elektronen (Back-Scatter-Elektronen; BSE) erstellt werden. Diese BS-Elektronen werden von einem speziellen Detektor (BEC-Detektor) erfasst und bildlich durch unterschiedliche Grauwerte dargestellt.

Durch das Auftreffen des Elektronenstrahls auf die Atome der Probe werden neben Sekundärelektronen und BS-Elektronen auch Röntgenstrahlen emittiert. Durch den Elektronenstrahl wird aus der inneren Schale des Atoms ein Elektron herausgeschlagen; die so entstandene Lücke wird durch ein höherwertiges Elektron aufgefüllt und die restliche Energie als Röntgenquant freigesetzt. Die so entstandene Röntgenstrahlung ist für jedes Element spezifisch und erlaubt eine Quantifizierung der Elemente innerhalb einer Probe. Für die Energiedispersive Röntgenspektroskopie wird

diese charakteristische Röntgenstrahlung mit einem speziellen Detektor (EDX-Detektor) erfasst.

In den folgenden Analysen sollte sowohl die Elementverteilung auf der Oberfläche mit einem EDX-Detektor als auch die Topographie der Oberfläche mit dem SE-Detektor dargestellt werden. Anschließend wurden die Proben in Kunststoff eingebettet, Querschnitte hergestellt und sowohl die Elementverteilung als auch die Materialkontrastbilder der Querschnitte untersucht.

### **Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX)**

Nach der Bestimmung der Oberflächenrauigkeit wurden die Proben vorsichtig von ihrem Probenträger abgelöst und auf Rasterteller (Mat. 13) geklebt. Dazu wurden leitfähige Haftaufkleber (Mat. 14) verwendet. Anschließend wurden die Proben 3 Tage bei Raumluft getrocknet. Danach wurden sie mit einem Sputtergerät (Mat. 15) für eine Minute mit Gold beschichtet. Dies erfolgte bei Raumtemperatur unter einer Argonatmosphäre (8 Pa) bei einer Stromstärke von 20 mA.

Für die Energiedispersive Röntgenspektroskopie wurde ein Rasterelektronenmikroskop mit Wolframkathode (Mat. 16) und einem Siliziumdrift-detektor (Mat. 17) genutzt. Die Hochspannung betrug 15 kV. Der Arbeitsabstand (15 mm), die Zählrate (ca. 1 kc/s), die Spotgröße, der Neigungswinkel und der Scan-Modus wurden konstant gehalten. Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von 120 Sekunden. Es wurde eine Bildgröße von 300 µm x 400 µm erfasst. Mit dem SE-Detektor wurde ein repräsentatives Areal ausgewählt und die Messung mit dem EDX-Detektor durchgeführt.

Die Reproduktionsmessungen zeigten für das 10malige Aufsuchen der selber Stelle auf einer Probe eine Standardabweichung von 0,17 und für das 10malige Untersuchen einer Probe eine Standardabweichung von 0,25.

Die Auswertung der Spektren wurde mit dem Softwarepaket Esprit (Mat. 18) durchgeführt. Es erfolgte eine standardfreie Analyse unter Verwendung der Peak-zu-Untergrund-ZAF-Korrektur (Korrektur der Faktoren Ordnungszahl, Absorption und Fluoreszenz). Es wurden folgende Elemente quantifiziert: Kalzium (Ca), Kohlenstoff (C), Phosphor (P), Sauerstoff (O) und Zinn (Sn). Gold (Au) wurde entfaltet aber nicht in die Quantifizierung eingerechnet, da es, um eine elektrostatische Aufladung zu verhindern, nachträglich auf die Probenoberfläche gebracht wurde. Abbildung 1 zeigt ein Spektrum einer unbehandelten Schmelzprobe.

Da sich bei der Auswertung deutliche Unterschiede im Kohlenstoffgehalt zwischen in vitro und in situ ergaben, erfolgte zusätzlich noch eine kohlenstoffbereinigte Auswertung der in situ-Proben.

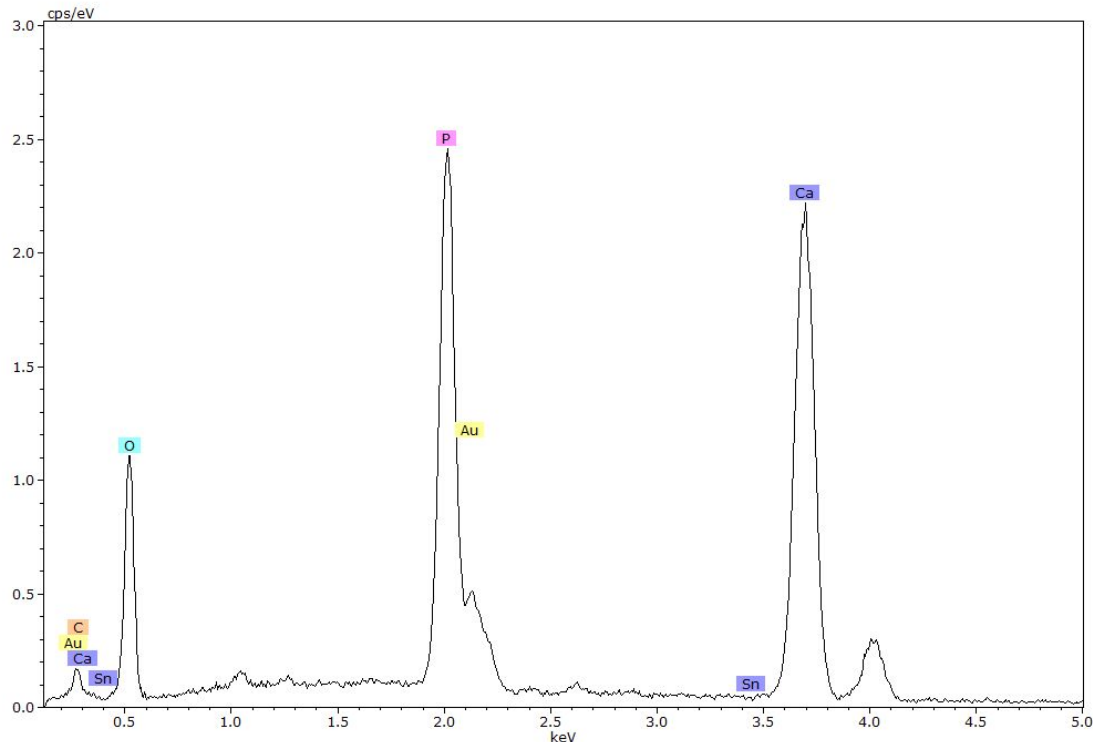


Abbildung 1: Spektrum einer unbehandelten Schmelzprobe; aufgenommen mit einem Rasterelektronenmikroskop mit Wolframkathode (Mat. 16) und Siliziumdrift-detektor (Mat. 17), bei einer Spannung von 15 kV, einem Arbeitsabstand von 15 mm und einer Zählrate von ca. 1 kc/s. Markiert sind die Peaks der quantifizierten Elemente: Kalzium (Ca), Kohlenstoff (C), Phosphor (P), Sauerstoff (O) und Zinn (Sn). Gold (Au).

### In vitro:

Aus den Gruppen, die mit zinnhaltigen Pasten behandelt wurden, wurden alle Proben analysiert ( $n = 15$  je Gruppe). Aus den NaF- und Placebogruppen wurden zufällig jeweils 5 Proben ausgewählt.

Aus der zuvor erwähnten anderen in vitro Studie wurden von einem anderen Doktoranden (Matthias Jung) 15 Proben der F/Sn Paste untersucht und die Daten für die vorliegende Studie zum Vergleich herangezogen.

### In situ:

Aus allen Gruppen, die mit zinnhaltigen Pasten behandelt wurden, wurden je 15 gebürstete und 15 ungebürstete Proben analysiert. Aus den NaF- und Placebogruppen wurden zufällig 5 gebürstete und 5 ungebürstete Proben ausgewählt und untersucht.

In einem zusätzlichen Experiment wurden aus einer der in situ Studien jeweils 10 zuvor noch nicht analysierte Proben pro Gruppe ( $n = 50$ ) zuerst röntgenspektroskopisch untersucht, dann, entsprechend der Demineralisationszeit der in situ Studie, zwei Minuten in der 0,5%iger Zitronensäure geschwenkt (Schüttelfrequenz 30/min, Mat. 8) und anschließend nochmals röntgenspektroskopisch untersucht. Diese Messungen erfolgten, um die Säurestabilität der Elemente auf der Oberfläche zu untersuchen.

Nach einer morphologischen Analyse der Oberfläche (siehe unten) wurden die Proben in lichthärtendem Kunststoff (Mat. 1) eingebettet, um eine Analyse von Querschnitten der Proben zu ermöglichen. Hierzu wurden die Proben senkrecht in eine Silikonform geklebt, welche mit einem lichthärtenden Kunststoff (Mat. 1) aufgefüllt wurde. Die Proben wurden auf Plexiglasplatten geklebt und mit einer diamantierten Bandsäge (Mat. 2) etwa in der Mitte senkrecht zur Probenoberfläche und senkrecht zum Verlauf der Grenze zwischen Versuchs- und Referenzfläche durchgesägt. Anschließend wurden die Proben mit Schleifpapier (Mat. 19) plangeschliffen, mit einer diamantierten Schleifscheibe mit  $3\text{ }\mu\text{m}$  Körnung poliert (Mat. 3) und dann für eine Minute mit Gold beschichtet (Mat. 15).

Für die EDX-Analyse wurden die eingebetteten Proben im Rasterelektronenmikroskop bei 5000facher Vergrößerung auf ein repräsentatives Areal untersucht. Dort wurde ein Messfeld von  $24 \times 1\text{ }\mu\text{m}$  an der Kante zur Probenoberfläche festgelegt. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich kein Kunststoff im Messfeld befand (siehe Abbildung 2).

Die Messung der Proben und Auswertung der Spektren erfolgte wie oben beschrieben.

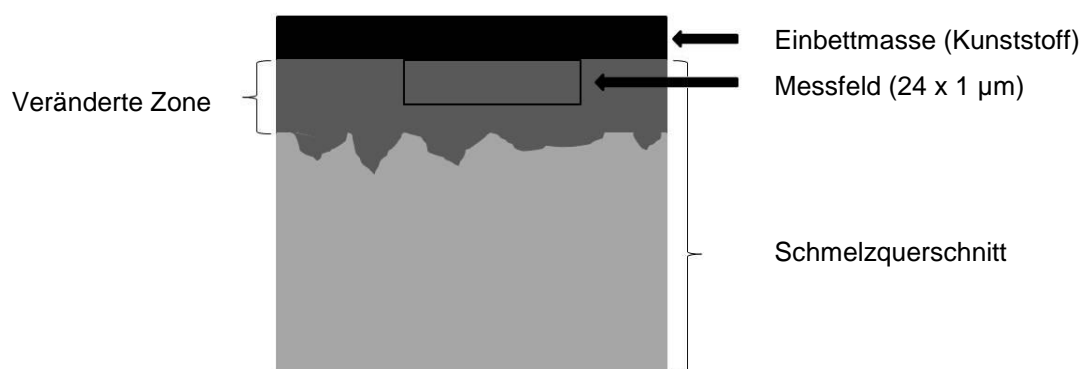


Abbildung 2: Schemazeichnung der EDX-Analyse der Querschnitte. Das Messfeld liegt in einer veränderten Zone des Schmelzquerschnittes an der Oberfläche, welche sich als dunkles Band darstellte. Dabei wurde ein möglichst geringer Abstand zur Oberfläche angestrebt, die Einbettmasse jedoch nicht berührt.

## **Rasterelektronenmikroskopie**

Für Untersuchungen der Topographie der Oberfläche wurden aus den jeweils 15 Proben der zinnhaltigen Gruppen aus allen Studien nach der EDX-Analyse jeweils 5 Proben zufällig ausgewählt. Von den NaF- und Placebopasten wurden dieselben Proben wie zuvor beschrieben verwendet.

Aus dem erwähnten zusätzlichen Experiment zur Untersuchung der Säurestabilität wurden pro Gruppe jeweils 5 Proben ausgewählt.

Nach der energiedispersiven Röntgenspektroskopie wurde die Struktur der Probenoberfläche beziehungsweise die Materialkontrastbilder der Querschnitte untersucht. Dazu wurde für die Oberflächen ein SE-Detektor und für die Querschnitte der BEC-Detektor verwendet. Die Hochspannung betrug 15 kV, der Arbeitsabstand wurde bei 9 mm konstant gehalten.

Die Oberflächen wurden in 3 verschiedenen Vergrößerungen aufgenommen (10000x, 5000x, 1500x, bezogen auf einen 6 x 8 cm Mittelformatfilm). Die Aufnahme der Bilder der Querschnitte erfolgte bei 5000facher Vergrößerung.

Anhand der Bilder der Oberflächen in 1500x Vergrößerung wurde die Struktur hinsichtlich folgender Parameter beurteilt und kategorisiert:

1. Ist ein Ätzmuster erkennbar (Ja/Nein)?
2. Wie ist die Beschaffenheit der Oberfläche (glatt, zerklüftet)?
3. Sind Präzipitate zu sehen (Ja/Nein)?
4. Welche Strukturen sind erkennbar (Schollen, Krusten, Schleifspuren)

Der Kappa-Wert der intrapersonellen Übereinstimmung betrug dabei für die Parameter Ätzmuster und Präzipitate 1, für die unterschiedlichen Strukturmerkmale (Schollen, Krusten, Schleifspuren) 0,88.



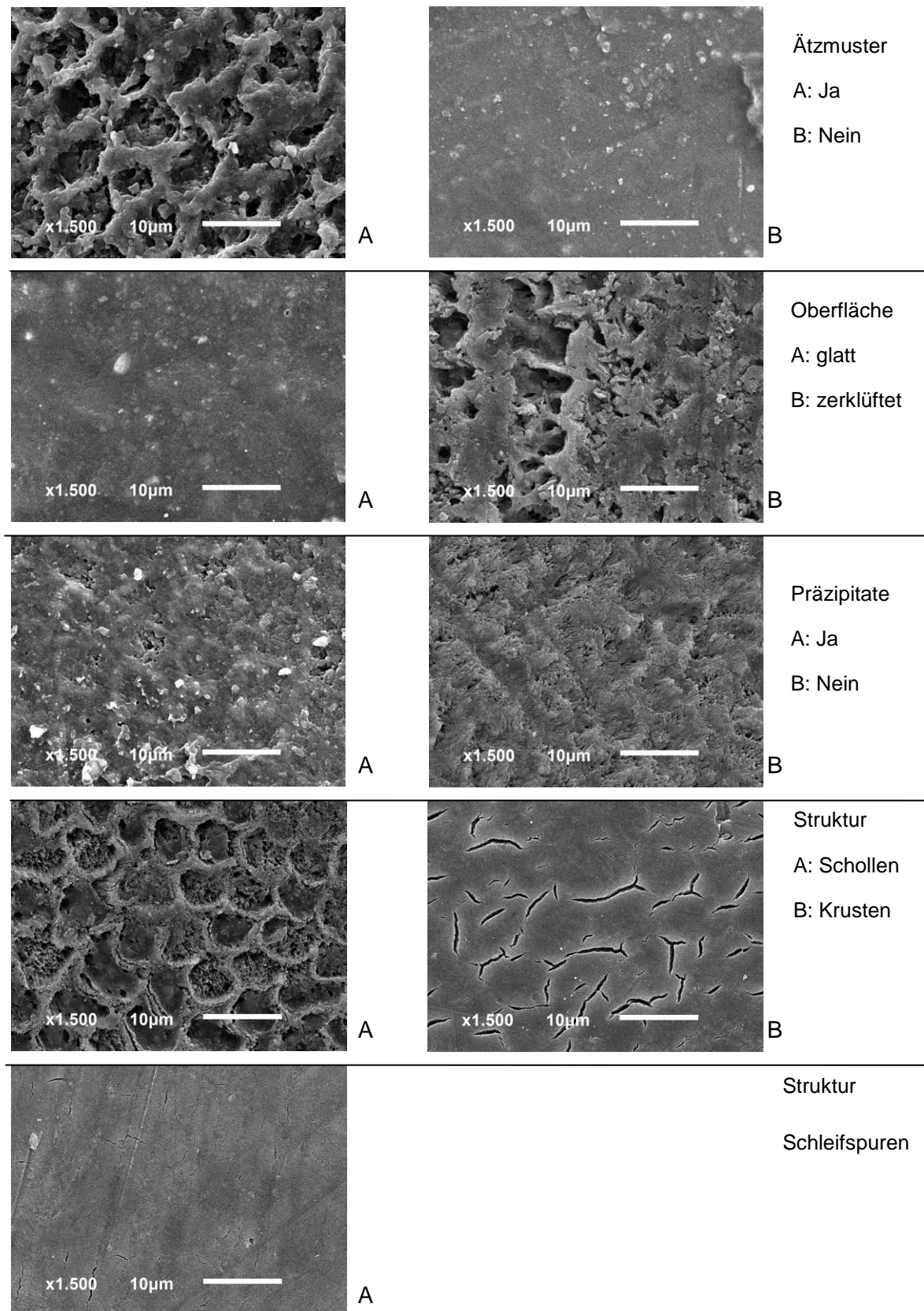


Abbildung 3: Beispielbilder in 1500-facher Vergrößerung für die verwendeten Kategorien der qualitativen Strukturanalyse.

## 2.5 Statistik

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels IBM SPSS 20.0 für Windows, IBM Corporation. Zur Überprüfung von Abweichungen von der Normalverteilung der stetig skalierten Daten (Zinngehalt und Rauigkeit) wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test verwendet.

Die Daten für Rauigkeit, Zinnablagerung auf der Oberfläche und Zinnretention unter erosiven Bedingungen zeigten keine signifikante Abweichung von der Normalverteilung. Für diese Daten erfolgte der Vergleich der Gruppen untereinander mit einer einfachen Varianzanalyse (ANOVA).

Für die Rauigkeitswerte wurde Tukey's post hoc Test für den Vergleich der verschiedenen Zahnpasten verwendet (Levene's Test ergab keine signifikante Abweichung von der Homogenität der Varianzen). Der Vergleich der in vitro mit den korrespondierenden in situ Daten wurde mit dem t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Der Vergleich der gebürsteten in situ Proben mit den ungebürsteten in situ Proben erfolgte mit einer einfachen Varianzanalyse (ANOVA).

Der Zinngehalt auf der Oberfläche nach Verwendung der verschiedenen Zahnpasten wurde mit einer ANOVA und Tamhane's post hoc Test verglichen (Levene's Test ergab eine signifikante Abweichungen von der Homogenität der Varianzen). Die korrespondierenden Daten der in vitro und in situ Studie wurden mit dem t-Test für unabhängige Stichproben verglichen (sowohl vor als auch nach der Kohlenstoffbereinigung). Der Vergleich der Werte vor und nach der Kohlenstoffbereinigung erfolgte mit dem t-Test für gepaarte Stichproben. Der Vergleich der gebürsteten in situ Proben mit den ungebürsteten in situ Proben erfolgte mit einer einfachen Varianzanalyse (ANOVA).

Weil eine signifikante Abweichung von der Normalverteilung für die Daten des Zinngehalts in den Querschnitten der in vitro Studien gefunden wurde, wurde der Vergleich der Gruppen mit nicht parametrischen Tests durchgeführt (Kruskal-Wallis-Test, post hoc: Mann-Whitney-Test). In den Querschnitten der in situ Proben wurde kein Zinn gefunden, daher wurden keine Vergleiche zwischen in vitro und in situ Proben oder zwischen den gebürsteten und ungebürsteten in situ Proben durchgeführt. Die Stabilität von Zinn vor und nach Erosion wurde mit dem t-Test für gepaarte Stichproben getestet. Der Vergleich zwischen den verschiedenen Gruppen bezüglich der Zinnretention erfolgte mit einer ANOVA und Tamhane's post hoc Test (Levene's Test zeigte eine signifikante Abweichung von der Homogenität).

Das Signifikanzlevel wurde auf  $\alpha = 0,05$  festgesetzt. Für die Analyse der Querschnitte erfolgte eine Bonferroni Anpassung und das Signifikanzniveau wurde auf 0,005 festgesetzt.

Die Daten der qualitativen Strukturanalyse werden nur deskriptiv dargestellt, eine statistische Analyse erfolgte nicht.

## 2.6 Materialien und Chemikalien

### Materialliste

- Mat. 1: Lichthärtender Kunststoff  
Technovit 7230 VLC, Kulzer-Exact, Wehrheim, Deutschland
- Mat. 2: Exakt Trennschleifsystem  
Exakt-Apparatebau, Norderstedt, Deutschland
- Mat. 3: Diamantschleifscheiben; Körnung 30µm, 15µm, 3µm  
Bühler GmbH, Düsseldorf, Deutschland
- Mat. 4: Exakt Mikroschleifsystem  
Exakt-Apparatebau, Norderstedt, Deutschland
- Mat. 5: Bürstsimulator  
SD Mechatronik GmbH, Feldkirchen-Westerham, Deutschland
- Mat. 6: Messuhr  
Eurochron GmbH, Seebach, Deutschland
- Mat. 7: Mikroprozessor-pH-Meter 761  
Knick elektronische Messgeräte GmbH & Co, Berlin, Deutschland  
pH/P+ 1000 Einstabmesskette N 1041  
Schott, Mainz, Deutschland
- Mat. 8: Schütteltisch 3006,  
Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
- Mat. 9: Elmex Sensitiv Zahnbürste Extra Soft  
GABA AG, Therwil, Schweiz
- Mat. 10: Elektrische Zahnbürste  
Oral-B Professional Care 3000, Oral-B, Schwalbach am Taunus,  
Deutschland

- Mat. 11:      Optisches Profilometer MicroProf  
                 FRT CWL F 300 µm Sensor  
                 Fries Research & Technology, Bergisch-Gladbach, Deutschland
- Mat. 12:      Software Mark III  
                 Fries Research & Technology, Bergisch-Gladbach, Deutschland
- Mat. 13:      Rasterteller 0,5'' Aluminium Specimen Stubb  
                 Agor Scientific Limited, Stansted, England
- Mat. 14:      Leitfähige Haftaufkleber Plano Leit Tabs 12 mm Ø  
                 W. Plannet GmbH, Wetzlar, Deutschland
- Mat. 15:      Sputtergerät Sputter Coater JFC1200  
                 Jeol, Tokyo, Japan
- Mat. 16:      Rasterelektronenmikroskop JSM-6510  
                 mit der Software "SEM Control User Interface" Version 3 D4  
                 Jeol Germany GmbH, Eching, Deutschland
- Mat. 17:      Siliziumdriftdetektor X-Flash Detektor 410-M  
                 Bruker Nano GmbH, Berlin, Deutschland
- Mat. 18:      Softwarepaket Esprit  
                 Bruker Quantax AXS Mikroanalysis GmbH, Berlin, Deutschland
- Mat. 19:      Siliziumcarbid Schleifpapier, P 1200  
                 Leco, St. Joseph, Mo., USA

## Chemikalienliste

- Chem. 1: Thymollösung  
Thymol, Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
- Chem. 2: Zitronensäure-Monohydrat  
CAS-Nr. 5949-29-1  
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Chem. 3: Orthophosphorsäure  
CAS-Nr. 7664-38-2  
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Chem. 4: Kaliumchlorid  
CAS-Nr. 7447-40-7  
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Chem. 5: Natriumhydrogencarbonat  
CAS-Nr. 144-55-8  
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Chem. 6: Calciumchlorid  
CAS-Nr. 10043-52-4  
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Chem. 7: Ethanol (70%ig)  
Otto Fischar GmbH & Co KG, Saarbrücken, Deutschland
- Chem. 8: Chlorhexidindigluconat  
Chlorhexamed Fluid 0,1%,  
GlaxoSmithKline Consumer Healthcare GmbH & Co KG, Bühl,  
Deutschland

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Bestimmung der Oberflächenrauigkeit

##### *In vitro:*

In den Gruppen der in vitro Studie zeigte sich der höchste Mittenrauwert ( $R_a$ , Tab. 4) bei der NaF-haltigen Paste ( $0,31 \pm 0,07 \mu\text{m}$ ). Die Placebopaste und die zinn- und chitosanhaltige Zahnpaste zeigten ähnliche Werte (Placebo:  $0,29 \pm 0,04 \mu\text{m}$ ; F/Sn/Chitosan:  $0,28 \pm 0,04 \mu\text{m}$ , n.s). Eine geringere Oberflächenrauigkeit, verglichen mit den anderen Gruppen, wurde durch die Behandlung der Oberflächen mit GelKam erreicht. Dabei zeigte sich zwischen GelKam und der Placebopaste (GelKam 32% geringer als Placebo,  $p \leq 0,01$ ), zwischen GelKam und F/Sn/Chitosan (GelKam 27% geringer als F/Sn/Chitosan,  $p \leq 0,001$ ) sowie zwischen GelKam und der NaF-Paste (GelKam 41% geringer als NaF,  $p \leq 0,001$ ) ein signifikanter Unterschied. Unterschiede konnten außerdem beim Vergleich der F/Sn mit der F/Sn/Chitosan Paste (F/Sn 17% geringer als F/Sn/Chitosan,  $p \leq 0,05$ ) und der NaF-Paste (F/Sn 29% geringer als NaF,  $p \leq 0,001$ ) dargestellt werden. Auch die gemittelte Rautiefe ( $R_z$ ) war bei der NaF-Paste am größten ( $3,20 \pm 0,53 \mu\text{m}$ ). F/Sn/Chitosan und die Placebopaste zeigten ähnliche Werte. Die mit GelKam behandelte Gruppe zeigte auch hier den niedrigsten Wert (35% geringer als NaF). Signifikante Unterschiede bestanden zwischen GelKam und F/Sn/Chitosan (GelKam 19% geringer als F/Sn/Chitosan,  $p \leq 0,05$ ) sowie zwischen GelKam und der NaF-Paste (GelKam 35% geringer als NaF,  $p \leq 0,05$ ). F/Sn wies einen signifikant geringeren Wert auf als NaF (27%,  $p \leq 0,05$ )

##### *In situ:*

Die gebürsteten Proben der in situ Studien zeigten für GelKam den niedrigsten  $R_a$ -Wert ( $0,38 \pm 0,14 \mu\text{m}$ , Tab 4). Die Werte der anderen Gruppen waren ähnlich. Die gemittelte Rautiefe ( $R_z$ , Tab. 4) war bei den mit der Placebopaste behandelten Proben am niedrigsten ( $5,06 \pm 3,38 \mu\text{m}$ ).

Bei den ungebürsteten Proben wurde der niedrigste Mittenrauwert  $R_a$  in der Gruppe gemessen, die mit der F/Sn Paste behandelt wurde. Die gemittelte Rautiefe ( $R_z$ ) war bei den Proben, die mit GelKam behandelt wurden am niedrigsten. Es bestand in keinem Fall, sowohl für  $R_a$ , als auch für  $R_z$  ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen innerhalb der Proben aus den in situ Studien.

Der Vergleich der gebürsteten Proben der in vitro Studie mit den gebürsteten Proben der in situ Studien zeigte sowohl für die Werte Ra als auch für Rz signifikante Unterschiede bei F/Sn ( $p \leq 0,01$  für Ra,  $p \leq 0,05$  für Rz), F/Sn/Chitosan ( $p \leq 0,001$  für Ra und Rz) und GelKam ( $p \leq 0,05$  für Ra und Rz), wobei die Werte aus der in situ Studie immer höher waren. Bei der NaF-Paste war der Rz Wert der in situ Studie signifikant höher ( $p \leq 0,05$ ).

Die Werte für die Oberflächenrauigkeit der in vitro und in situ-Gruppen sind in Tabelle 4 wiedergegeben.

Tabelle 4: Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardabweichungen (SD) der profilometrisch gemessenen Oberflächenrauigkeit ( $\mu\text{m}$ , Ra = Mittenrauhwert, Rz = gemittelte Rautiefe) der Proben der in vitro und in situ Studien nach zyklischer Demineralisation und Remineralisation und Behandlung mit der jeweiligen Paste, mit (gebürstet) bzw. ohne Bürsten (ungebürstet) der Proben. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen innerhalb einer Studie sind mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben angegeben, zwischen den Studien innerhalb einer Gruppe mit unterschiedlichen Großbuchstaben; das Signifikanzniveau betrug 0,05.

Studie	Behandlung	Paste	Ra ( $\mu\text{m}$ , MW $\pm$ SD)	Rz ( $\mu\text{m}$ , MW $\pm$ SD)
in vitro	gebürstet	F/Sn	<sup>A</sup> 0,24 $\pm$ 0,03 <sup>b,c</sup>	<sup>A</sup> 2,51 $\pm$ 0,27 <sup>a,c</sup>
		F/Sn/Chitosan	<sup>A</sup> 0,28 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	<sup>A</sup> 2,83 $\pm$ 0,59 <sup>b,c</sup>
		GelKam	<sup>A</sup> 0,22 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	<sup>A</sup> 2,37 $\pm$ 0,40 <sup>a</sup>
		NaF	<sup>A</sup> 0,31 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	<sup>A</sup> 3,20 $\pm$ 0,53 <sup>b</sup>
		Placebo	<sup>A</sup> 0,29 $\pm$ 0,04 <sup>a,c</sup>	<sup>A</sup> 2,86 $\pm$ 0,40 <sup>a,b</sup>
in situ	gebürstet	F/Sn	<sup>B</sup> 0,38 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	<sup>B</sup> 5,54 $\pm$ 4,46 <sup>a</sup>
		F/Sn/Chitosan	<sup>B</sup> 0,39 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	<sup>B</sup> 5,41 $\pm$ 2,11 <sup>a</sup>
		GelKam	<sup>B</sup> 0,30 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	<sup>B</sup> 4,13 $\pm$ 2,60 <sup>a</sup>
		NaF	<sup>A</sup> 0,34 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	<sup>B</sup> 4,20 $\pm$ 0,51 <sup>a</sup>
		Placebo	<sup>A</sup> 0,35 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	<sup>A</sup> 5,06 $\pm$ 3,38 <sup>a</sup>
	ungebürstet	F/Sn	0,38 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	4,33 $\pm$ 1,82 <sup>a</sup>
		F/Sn/Chitosan	0,39 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	5,29 $\pm$ 3,08 <sup>a</sup>
		GelKam	0,39 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	4,21 $\pm$ 1,49 <sup>a</sup>
		NaF	0,51 $\pm$ 0,28 <sup>a</sup>	5,98 $\pm$ 4,62 <sup>a</sup>
		Placebo	0,44 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	6,20 $\pm$ 3,85 <sup>a</sup>



### 3.2 Bestimmung des Zinngehaltes mit der EDX-Analyse

#### Oberflächen

##### *In vitro:*

Auf den Oberflächen der in vitro Proben (Tab. 5) konnte bei den Zahnpasten NaF und Placebo kein Zinn festgestellt werden. Bei den zinnhaltigen Gruppen war der Zinngehalt für GelKam am höchsten und am niedrigsten für F/Sn. Die F/Sn/Chitosan Gruppe siedelte sich dazwischen an. Es bestanden signifikante Unterschiede im Zinngehalt zwischen allen mit Zinn behandelten Gruppen ( $p \leq 0,001$ ). F/Sn/Chitosan wies 22% weniger und F/Sn 60% weniger Zinn auf als GelKam. F/Sn zeigte einen um 57% niedrigeren Wert als F/Sn/Chitosan.

##### *In situ:*

Auf den Proben der in situ Studien (Tab. 5) konnte bei den gebürsteten und bei den ungebürsteten Proben für die NaF- und die Placebopaste kein Zinn auf der Oberfläche nachgewiesen werden.

Es bestanden bei den gebürsteten Proben signifikante Unterschiede im Zinngehalt zwischen den zinnhaltigen Gruppen und den Gruppen ohne Zinn: F/Sn: ( $p \leq 0,01$  verglichen mit Paste NaF;  $p \leq 0,05$  verglichen mit der Placebopaste), F/Sn/Chitosan: ( $p \leq 0,001$  verglichen mit den Pasten NaF und Placebo), GelKam: ( $p \leq 0,01$  verglichen mit Paste NaF und Placebo). Bei den zinnhaltigen Gruppen zeigte GelKam den höchsten Zinngehalt. Verglichen mit GelKam wiesen F/Sn 81% weniger Zinn und F/Sn/Chitosan 77% weniger Zinn auf der Oberfläche ( $p \leq 0,05$ ) auf. Zwischen den beiden zinnhaltigen Pasten F/Sn und F/Sn/Chitosan bestand kein Unterschied.

Bei den ungebürsteten Proben zeigten sich ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den zinnhaltigen Zahnpasten und den Zahnpasten ohne Zinn: F/Sn: ( $p \leq 0,001$  verglichen mit der Placebopaste;  $p \leq 0,01$  verglichen mit Paste NaF), F/Sn/Chitosan: ( $p \leq 0,001$  verglichen mit Paste NaF und Placebo), GelKam: ( $p \leq 0,01$  verglichen mit Paste NaF und Placebo). Bei den zinnhaltigen Gruppen war für GelKam der höchste Zinngehalt und für F/Sn der niedrigste Zinngehalt zu finden. F/Sn/Chitosan siedelte sich dazwischen an. Verglichen mit GelKam zeigte F/Sn 75% weniger Zinn auf der Oberfläche ( $p \leq 0,05$ ), während F/Sn/Chitosan 58% weniger Zinn aufwies (n.s.). Zwischen den beiden zinnhaltigen Pasten F/Sn und F/Sn/Chitosan bestand kein Unterschied.

Der Vergleich der gebürsteten mit den ungebürsteten Gruppen eines Produktes der in situ Studie ergab keine signifikanten Unterschiede im Zinngehalt.

Der Vergleich der gebürsteten Proben der in vitro Studie mit den gebürsteten Proben der in situ Studie konnte für den Zinngehalt auf der Oberfläche bei der F/Sn/Chitosan Zahnpaste einen signifikant höheren Wert für die in vitro Proben zeigen ( $p \leq 0,001$ ). Für die anderen Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied gezeigt werden. Detaillierte Ergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Gemessener Zinngehalt (wt%) auf den Oberflächen der gebürsteten in vitro Proben sowie der gebürsteten und ungebürsteten in situ Proben; die Behandlung erfolgte mit den jeweiligen Zahnpasten. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen innerhalb einer Studie sind mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben angegeben, zwischen den Studien innerhalb einer Gruppe mit unterschiedlichen Großbuchstaben; das Signifikanzniveau betrug 0,05.

Studie	Behandlung	Paste	Zinngehalt (wt%, MW $\pm$ SD)
in vitro	gebürstet	F/Sn	<sup>A</sup> 0,90 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup>
		F/Sn/Chitosan	<sup>A</sup> 2,10 $\pm$ 0,40 <sup>b</sup>
		GelKam	<sup>A</sup> 2,70 $\pm$ 0,32 <sup>c</sup>
		NaF	<sup>A</sup> 0,03 $\pm$ 0,04 <sup>d</sup>
		Placebo	<sup>A</sup> 0,04 $\pm$ 0,05 <sup>d</sup>
in situ	gebürstet	F/Sn	<sup>A</sup> 0,73 $\pm$ 0,65 <sup>a</sup>
		F/Sn/Chitosan	<sup>B</sup> 0,90 $\pm$ 0,56 <sup>a</sup>
		GelKam	<sup>A</sup> 3,99 $\pm$ 3,32 <sup>b</sup>
		NaF	<sup>A</sup> 0,02 $\pm$ 0,05 <sup>c</sup>
		Placebo	<sup>A</sup> 0,05 $\pm$ 0,07 <sup>c</sup>
	ungebürstet	F/Sn	0,76 $\pm$ 0,55 <sup>a</sup>
		F/Sn/Chitosan	1,28 $\pm$ 0,83 <sup>a,b</sup>
		GelKam	3,03 $\pm$ 2,64 <sup>b</sup>
		NaF	0,05 $\pm$ 0,10 <sup>c</sup>
		Placebo	0,01 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>

Während der Auswertung zeigten sich deutliche Unterschiede im Kohlenstoffgehalt (Abb. 4) zwischen den in vitro und in situ Proben. Daher erfolgte zusätzlich eine kohlenstoffbereinigte Auswertung der in situ Proben (Tab. 6).

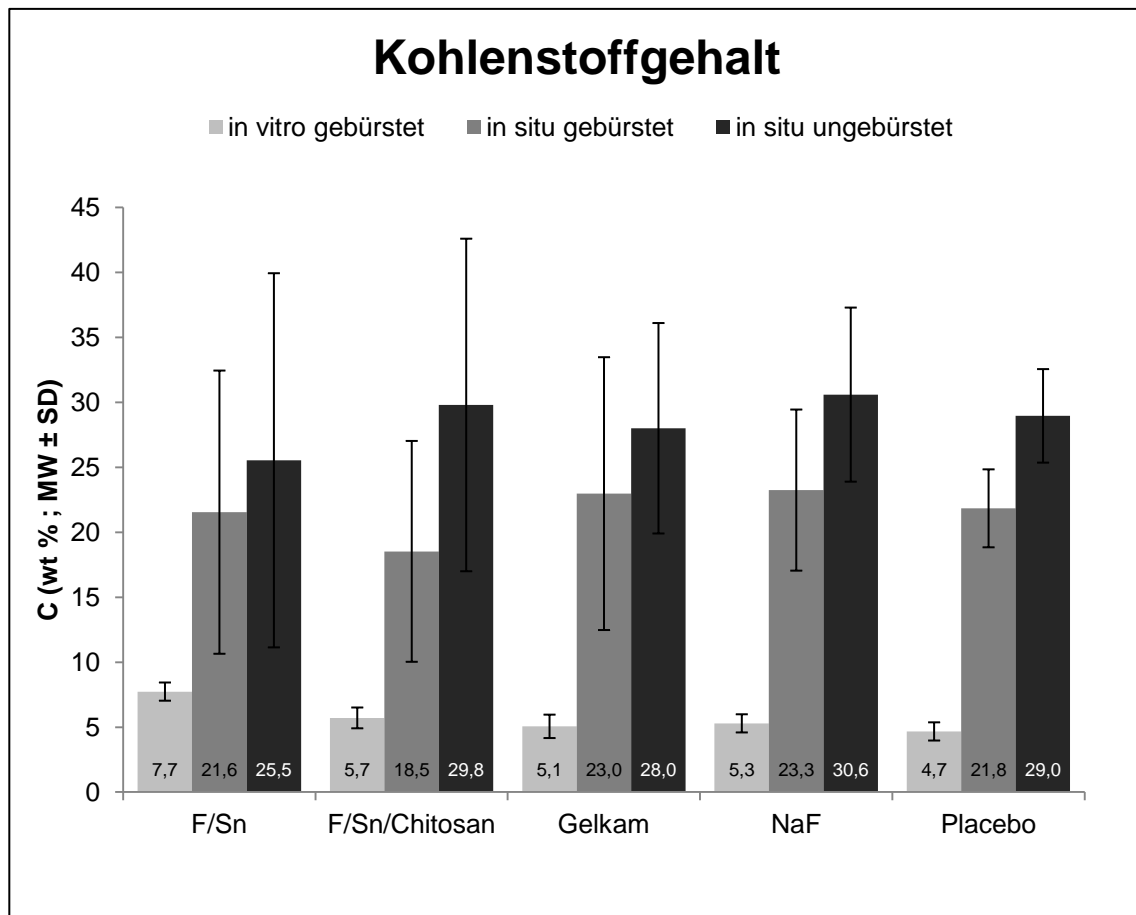


Abbildung 4: Kohlenstoffgehalt (wt%) auf den Oberflächen der gebürsteten in vitro Proben sowie der gebürsteten und ungebürsteten in situ Proben nach Behandlung mit den jeweiligen Zahnpasten. Der Vergleich der in vitro Proben mit den in situ Proben zeigte in allen Gruppen einen signifikant höheren Kohlenstoffgehalt auf den in situ Proben ( $p \leq 0,001$ ).

Nach der kohlenstoffbereinigten Auswertung (Tab. 6) stieg der Zinngehalt im Vergleich zur Auswertung mit Kohlenstoff signifikant. Für F/Sn/Chitosan um 22% ( $p \leq 0,05$ ) und für GelKam um 40% ( $p \leq 0,01$ ). Für F/Sn stieg der Zinngehalt nicht signifikant um 43%. Die Verhältnisse der Gruppen zueinander änderten sich jedoch nicht.

Tabelle 6: Zinngehalt (wt%) auf den Oberflächen, gemessen auf gebürsteten Proben der Gruppen F/Sn, F/Sn/Chitosan und GelKam der in situ Studie. Auswertung mit Kohlenstoff beziehungsweise kohlenstoffbereinigt. Signifikante Unterschiede in einer Zeile sind mit unterschiedlichen Kleinbuchstaben angegeben.

Paste	Zinngehalt (wt%, MW $\pm$ SD)	Zinngehalt (wt%, MW $\pm$ SD)
	<i>mit Kohlenstoff</i>	<i>ohne Kohlenstoff</i>
F/Sn	0,7 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	1,0 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>
F/Sn/Chitosan	0,9 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	1,1 $\pm$ 0,9 <sup>b</sup>
GelKam	4,0 $\pm$ 3,3 <sup>a</sup>	5,6 $\pm$ 4,6 <sup>b</sup>

Zwischen den gebürsteten Proben der in vitro und der in situ Studie, die mit zinnhaltigen Pasten behandelt wurden, ergaben sich bei der kohlenstoffbereinigten Auswertung zum Teil signifikante Unterschiede (Abb. 5). Der Zinngehalt für F/Sn/Chitosan war bei den in vitro Proben 91% höher ( $p \leq 0,01$ ) und für GelKam 52% niedriger ( $p \leq 0,05$ ) als bei den in situ Proben. Für F/Sn war der Zinngehalt der in vitro Proben 10% niedriger als bei den in situ Proben (nicht signifikant).

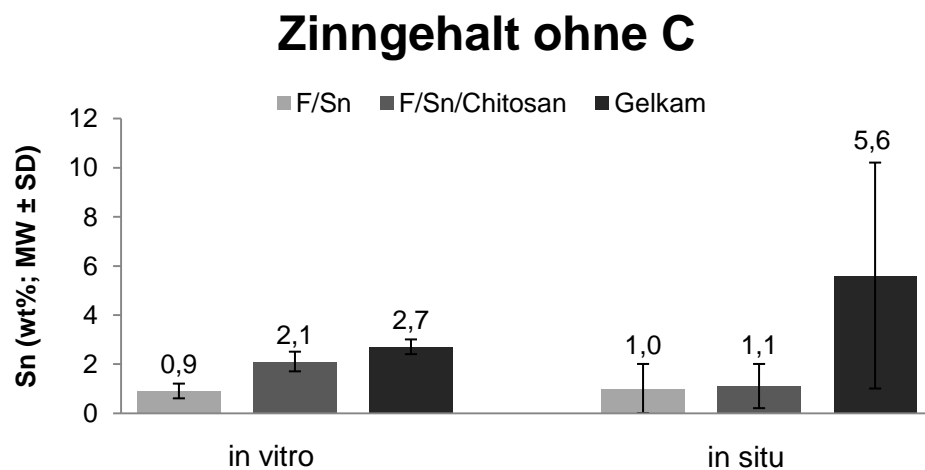


Abbildung 5: Zinngehalt auf den Oberflächen der gebürsteten Proben der in vitro und in situ Studien, nachdem diese zyklisch demineralisiert und mit den Zahnpasten F/Sn, F/Sn/Chitosan und GelKam behandelt wurden. Die Auswertung erfolgte kohlenstoffbereinigt.

### **Oberflächen vor und nach zusätzlicher Säureexposition**

Die Auswertung der in situ Proben vor und nach einer zusätzlichen Säureexposition zeigte, dass der Zinngehalt auf den Oberflächen relativ stabil blieb.

Die Proben, die mit GelKam behandelt wurden, zeigten sowohl bei den gebürsteten, als auch bei den ungebürsteten Proben keine Veränderung des Zinngehaltes nach Säureexposition. Bei den gebürsteten Proben gab es nach Verwendung der Zahnpaste F/Sn einen Verlust an Zinngehalt von 0,23 wt% (24% Reduktion,  $p \leq 0,001$ ) bei Verwendung der Zahnpaste F/Sn/Chitosan einen Verlust von 0,26 wt% (24% Reduktion,  $p \leq 0,001$ ). Für die ungebürsteten Proben war ein geringerer Verlust zu finden. Für Paste F/Sn 0,18 wt % (17% Reduktion,  $p \leq 0,05$ ) und 0,15 wt% (15% Reduktion,  $p \leq 0,01$ ) für Paste F/Sn/Chitosan.

### **Querschnitte**

#### ***In vitro:***

Die Proben der in vitro Studie, die mit den zinnhaltigen Zahnpasten behandelt wurden, zeigten eine Einlagerung von Zinn in die oberen Schichten der Querschnitte (Paste F/Sn MEDIAN: 0,03 wt%, MIN: 0 wt%, MAX: 0,6 wt%; Paste F/Sn/Chitosan MEDIAN: 1,26 wt%, MIN: 0,5 wt%, MAX: 2,5 wt%; GelKam MEDIAN: 1,22 wt%, MIN: 0,9 wt%, MAX: 2,0 wt%.) Die Proben der Pasten NaF und Placebo wiesen kein Zinn in den Querschnitten auf (MEDIAN = 0 wt%).

Der Vergleich der Gruppen untereinander zeigte für die Gruppen F/Sn/Chitosan und GelKam signifikante Unterschiede zu den zinnfreien Kontrollgruppen NaF und Placebo ( $p \leq 0,001$ ). Beim Vergleich mit der Zahnpaste F/Sn zeigte sowohl F/Sn/Chitosan als auch GelKam signifikant höhere Zinnwerte ( $p \leq 0,001$ ). Der Vergleich der Pasten GelKam und F/Sn/Chitosan untereinander ergab keinen signifikanten Unterschied.

#### ***In situ:***

In den Querschnitten der Gruppen der in situ Studie konnte kein Zinn festgestellt werden (MEDIAN in allen Gruppen 0 wt%).

### 3.3 Qualitative Strukturanalyse

Die qualitative Strukturanalyse der Oberflächen ergab nur geringe Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen, sowohl zwischen den gebürsteten, als auch zwischen den ungebürsteten Gruppen. Auch beim Vergleich der zinnhaltigen Gruppen der in vitro Studie mit den zinnhaltigen Gruppen der in situ Studie waren kaum Unterschiede zu erkennen. In der in vitro Studie wurden weniger Präzipitate gefunden als in der in situ Studie, dort waren alle Proben von Präzipitaten bedeckt. Die Ablagerungen auf den Oberflächen variierten von einzelnen globulären oder amorphen Präzipitaten zu flächenhaft bedeckenden Schichten, wobei einige von wolkiger Struktur und unscharf begrenzt erschienen und andere eine scharf begrenzte, krustenähnliche Oberfläche zeigten. Diese krustenähnlichen Strukturen wiesen zum Teil Risse auf. Die Tabellen 7-10 zeigen die Ergebnisse der Strukturanalyse der Oberflächen.

Die Analyse der Querschnitte ergab sowohl in vitro als auch in situ keine Unterschiede zwischen den Gruppen. In allen Gruppen zeigte sich an der Oberfläche eine Schicht, die eine dunklere Färbung als die restliche Zahnhartsubstanz aufwies.

Zum Teil verlief dieses Band wellenförmig oder zeigte eine Art Schichtung, wobei sich hellere und dunklere Abschnitte abwechselten.

Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Behandlung der Proben (gebürstet/ungebürstet), der Studienart (in vitro/in situ) oder den verschiedenen Zahnpasten zu der Breite oder der Beschaffenheit der dunkleren Zone erkannt werden.

Auch die Elementanalyse ergab keinen Zusammenhang zwischen Elementverteilung und Aussehen der Schicht.

Die Abbildungen 6-8 zeigen für die verschiedenen Gruppen exemplarische Bilder der Strukturanalyse der Oberflächen und der Querschnitte sowie die zugehörigen EDX-Schriebe.

Tabelle 7: Verteilung der Strukturmerkmale "Ätzmuster" und Präzipitate" nach qualitativer Strukturanalyse der Probenoberflächen mit dem Rasterelektronenmikroskop bei 1500-facher Vergrößerung. Es wurden in vitro und in situ Proben nach zyklischer Demineralisation in 0,5%iger Zitronensäure und Behandlung mit den jeweiligen Zahnpasten, und in situ Proben, die nach der Behandlung mit den Zahnpasten zusätzlich für zwei Minuten in 5%iger Zitronensäure geschwenkt wurden, verwendet. Die Werte sind in Prozent angegeben.

Studie	Ätzmuster		Präzipitate	
	Ja	Nein	Ja	Nein
in situ (gesamt)	82	18	100	0
<i>(gebürstet/ungebürstet)</i>	<i>(80/84)</i>	<i>(20/16)</i>	<i>(100/100)</i>	<i>(0/0)</i>
zinnhaltige Gruppen	80	20	100	0
<i>(gebürstet/ungebürstet)</i>	<i>(80/80)</i>	<i>(20/20)</i>	<i>(100/100)</i>	<i>(0/0)</i>
NaF/Placebo	85	15	100	0
<i>(gebürstet/ungebürstet)</i>	<i>(80/90)</i>	<i>(20/10)</i>	<i>(100/100)</i>	<i>(0/0)</i>
in situ (zinnhaltige Gruppen nach zusätzlicher Erosion)	67	33	80	20
<i>(gebürstet/ungebürstet)</i>	<i>(73/60)</i>	<i>(27/40)</i>	<i>(87/73)</i>	<i>(13/27)</i>
in vitro (gesamt)	100	0	75	25
zinnhaltige Gruppen	100	0	80	20
NaF/Placebo	100	0	70	30

Die Unterteilung der Gruppen in zinnhaltige Gruppen und solche ohne Zinn zeigte nur geringe Unterschiede (Tabelle 7). In der in situ Studie zeigten 80% der Proben der zinnhaltigen Pasten ein Ätzmuster, während die Gruppen ohne Zinn bei 85% ein Ätzmuster zeigten.

In der in vitro Studie unterschied sich der Parameter „Präzipitate“ insofern, dass 80% der zinnhaltigen, und 70% der Gruppen ohne Zinn Präzipitate auf der Oberfläche zeigten.



Tabelle 8: Verteilung der Strukturmerkmale "Ätzmuster" und Präzipitate" nach qualitativer Strukturanalyse der Probenoberflächen mit dem Rasterelektronenmikroskop bei 1500-facher Vergrößerung. Es wurden in vitro und in situ Proben nach zyklischer Demineralisation in 0,5%iger Zitronensäure und Behandlung mit den jeweiligen Zahnpasten, und in situ Proben, die nach der Behandlung mit den Zahnpasten zusätzlich für zwei Minuten in 5%iger Zitronensäure geschwenkt wurden, verwendet. Die Werte sind in Prozent angegeben; die Ergebnisse sind unterteilt in Gruppen, die mit Chitosan behandelt wurde und in Gruppen, die nur mit Zinn, jedoch ohne Chitosan, behandelt wurden.

Studie	Ätzmuster		Präzipitate	
	Ja	Nein	Ja	Nein
in situ (gesamt)	82	18	100	0
(gebürstet/ungebürstet)	(80/84)	(20/16)	(100/100)	(0/0)
F/Sn/Chitosan	100	0	100	0
(gebürstet/ungebürstet)	(100/100)	(0/0)	(100/100)	(0/0)
F/Sn + GelKam	70	30	100	0
(gebürstet/ungebürstet)	(70/70)	(30/30)	(100/100)	(0/0)
<hr/>				
in situ (alle zinnhaltige Gruppen nach zusätzlicher Erosion)	67	33	80	20
(gebürstet/ungebürstet)	(73/60)	(27/40)	(87/73)	(13/27)
F/Sn/Chitosan	70	30	70	30
(gebürstet/ungebürstet)	(80/60)	(20/40)	(100/40)	(0/60)
F/Sn + GelKam	65	35	85	15
(gebürstet/ungebürstet)	(70/60)	(30/40)	(80/90)	(20/10)
<hr/>				
in vitro (gesamt)	100	0	75	25
F/Sn/Chitosan	100	0	100	0
F/Sn + GelKam	100	0	60	40

Bei der Unterteilung in Gruppen, die mit beziehungsweise ohne Chitosan behandelt wurden, wurden kleine Unterschiede sichtbar (Tabelle 8). In der in situ Studie war auf den Proben mit Chitosan immer ein Ätzmuster sichtbar, während bei den Proben ohne Chitosan nur bei 70% ein Ätzmuster zu sehen war. Bei den in situ Proben, die zusätzlich mit Säure behandelt wurden, zeigte sich nach Behandlung mit der F/Sn/Chitosan-Zahnpaste bei 40% der Proben Präzipitate, bei den Gruppen ohne Chitosan waren es 90%. In der in vitro Studie zeigten alle Proben ein Ätzmuster, während sich der Parameter „Präzipitate“ unterschied. Während die Gruppen, die mit Chitosan behandelt wurden, alle Präzipitate aufwiesen, waren es bei den Gruppen ohne Chitosan nur 60%.

Tabelle 9: Verteilung der Merkmale "Rauigkeit" und "Struktur" nach qualitativer Strukturanalyse der Probenoberflächen mit dem Rasterelektronenmikroskop bei 1500-facher Vergrößerung. Es wurden in vitro und in situ Proben nach zyklischer Demineralisation in 0,5%iger Zitronensäure und Behandlung mit den jeweiligen Zahnpasten, und in situ Proben, die nach der Behandlung mit den Zahnpasten zusätzlich für zwei Minuten in 5%iger Zitronensäure geschwenkt wurden, verwendet. Die Werte sind in Prozent angegeben.

Studie	Rauigkeit		Struktur			
	glatt	zerklüftet	Schuppen	Krusten	Schleifspuren	Keine
in situ (gesamt)	34	66	18	26	4	50
(gebürstet/ungebürstet)	(48/20)	(52/80)	(24/12)	(28/24)	(4/4)	(44/56)
zinnhaltige Gruppen	30	70	13	43	7	33
(gebürstet/ungebürstet)	(40/20)	(60/80)	(7/20)	(47/40)	(7/7)	(40/27)
NaF/Placebo	40	60	25	0	0	75
gebürstet/ungebürstet	(60/20)	(40/80)	(50/0)	(0/0)	(0/0)	(50/100)
<hr/>						
in situ (zinnhaltige Gruppen nach zusätzlicher Erosion)	17	83	13	43	3	40
(gebürstet/ungebürstet)	(27/7)	(73/93)	(27/0)	(33/53)	(7/0)	(33/47)
<hr/>						
in vitro (gesamt)	40	60	25	0	30	40
zinnhaltige Gruppen	30	70	10	0	60	30
NaF/Placebo	50	50	40	0	0	50

Bei der Untersuchung der Strukturen wurde ein deutlicher Unterschied sichtbar für den Parameter „Kruste“ beim Vergleich der zinnhaltigen in situ Proben mit den in situ Gruppen ohne Zinn (Tabelle 9). Bei den zinnhaltigen Gruppen zeigten fast 50% der Proben eine mit Krusten bedeckte Oberfläche, während die zinnfreien Gruppen keine Krusten zeigten. Im Vergleich zeigten die in situ Proben insgesamt bei 26% Krusten auf der Oberfläche, während in vitro keine Krusten zu sehen waren.

Für den Parameter „Rauigkeit“ und auch für die anderen Parameter zeigten sich sowohl beim Vergleich der Gruppen innerhalb der Studien als auch zwischen den Studien kaum Unterschiede.

Tabelle 10: Verteilung der Merkmale "Rauigkeit" und "Struktur" nach qualitativer Strukturanalyse der Probenoberflächen mit dem Rasterelektronenmikroskop bei 1500-facher Vergrößerung. Es wurden in vitro und in situ Proben nach zyklischer Demineralisation in 0,5%iger Zitronensäure und Behandlung mit den jeweiligen Zahnpasten, und in situ Proben, die nach der Behandlung mit den Zahnpasten zusätzlich für zwei Minuten in 5%iger Zitronensäure geschwenkt wurden, verwendet. Die Werte sind in Prozent angegeben; die Ergebnisse sind unterteilt in die Gruppen, die mit Chitosan behandelt wurde und in Gruppen, die nur mit Zinn, jedoch ohne Chitosan, behandelt wurden.

Studie	Rauigkeit		Struktur			
	glatt	zerklüftet	Schuppen	Krusten	Schleifspuren	Keine
in situ (gesamt)	34	66	18	26	4	50
(gebürstet/ungebürstet)	(48/20)	(52/80)	(24/12)	(28/24)	(4/4)	(44/56)
F/Sn/Chitosan	20	80	0	40	10	40
(gebürstet/ungebürstet)	(20/20)	(80/80)	(0/0)	(40/40)	(20/0)	(40/40)
F/Sn + GelKam	35	65	20	45	5	30
(gebürstet/ungebürstet)	(50/20)	(50/80)	(10/30)	(50/40)	(0/10)	(40/20)
<hr/>						
in situ (zinnhaltige Gruppen nach zusätzlicher Erosion)	17	83	13	43	3	40
(gebürstet/ungebürstet)	(27/7)	(73/93)	(27/0)	(33/53)	(7/0)	(33/47)
F/Sn/Chitosan	20	80	20	30	0	50
(gebürstet/ungebürstet)	(40/0)	(60/100)	(40/0)	(20/40)	(0/0)	(40/60)
F/Sn + GelKam	15	85	10	50	5	35
(gebürstet/ungebürstet)	(20/10)	(80/90)	(20/0)	(40/60)	(10/0)	(30/40)
<hr/>						
in vitro (gesamt)	40	60	25	0	30	40
F/Sn/Chitosan	100	0	0	0	60	40
F/Sn + GelKam	60	40	20	0	60	20

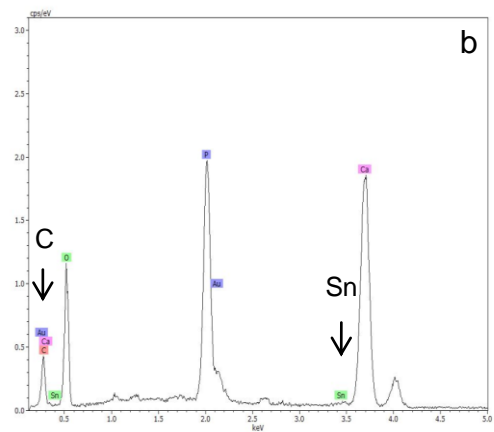
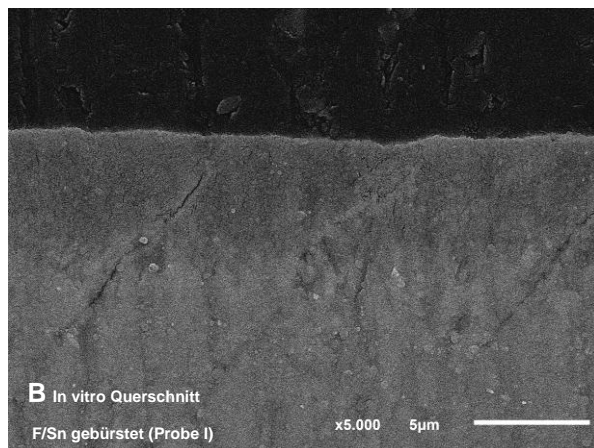
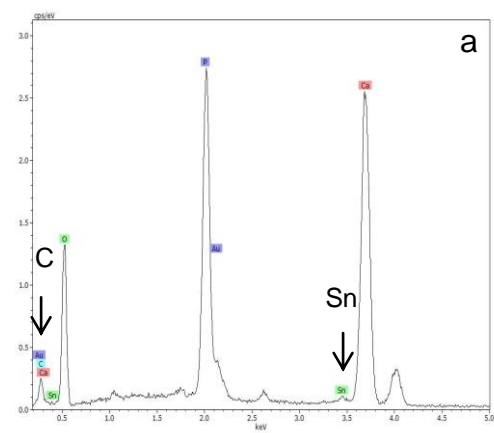
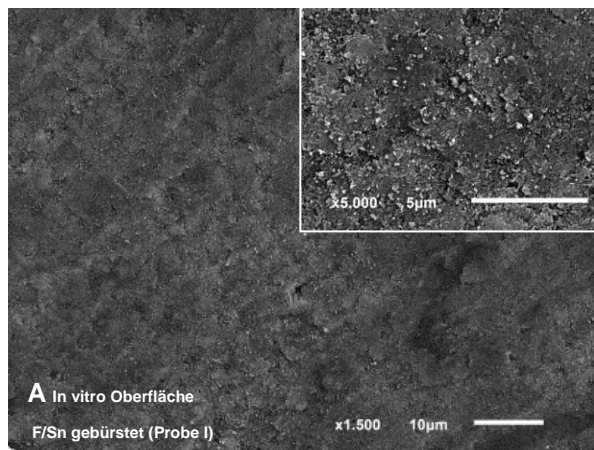
Bei der Unterteilung in Gruppen, die mit beziehungsweise ohne Chitosan behandelt wurden, wurden kleine Unterschiede bezüglich der Parameter „Rauigkeit“ und „Struktur“ sichtbar (Tabelle 10). Bei den mit Chitosan behandelten Gruppen traten weniger oft Schuppen auf als bei der Gruppen ohne Chitosan, sowohl in vitro als auch in situ.

In vitro zeigte die F/Sn/Chitosan Paste bei allen Proben eine glatte Oberfläche, während bei den anderen zinnhaltigen Pasten 60% eine glatte und 40% eine zerklüftete Oberfläche zu sehen war.

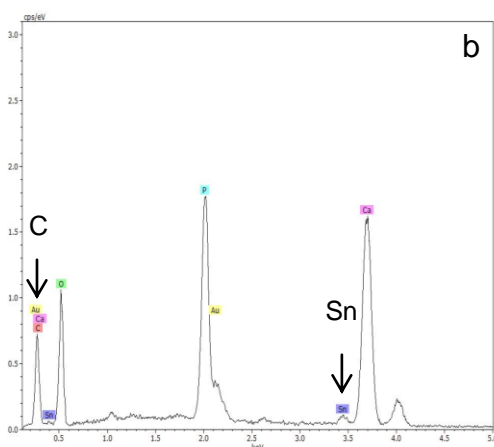
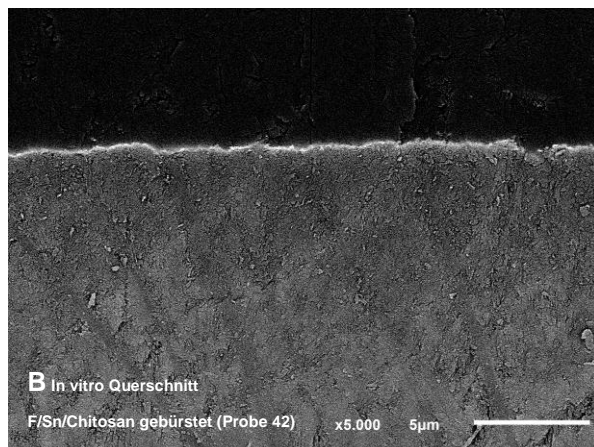
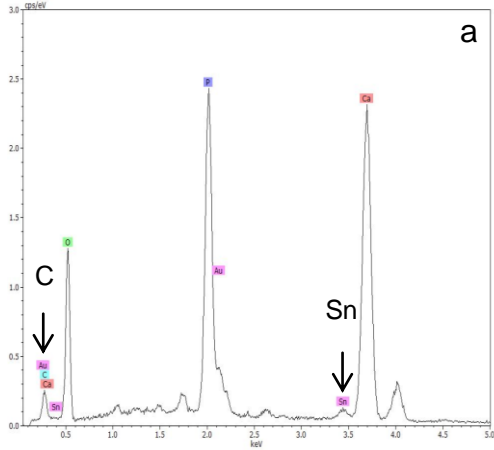
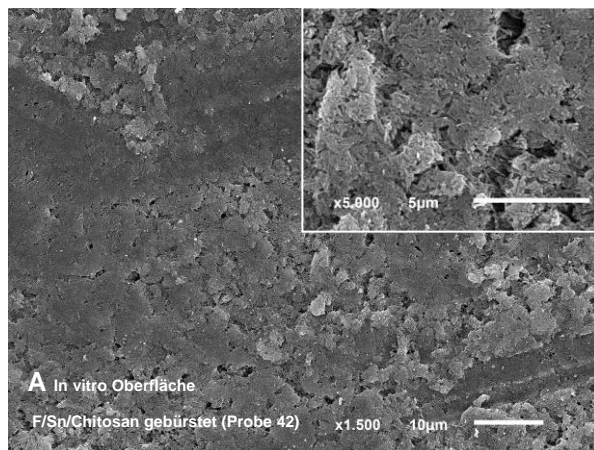
Bei den in situ Proben zeigten insgesamt 26% der Proben Krusten, die Verteilung innerhalb der Gruppen zeigte keine Unterschiede. Auf den Proben der in vitro Studien zeigten sich keine Krusten.

Sowohl in situ als auch in vitro waren Schleifspuren zu sehen. Es ergaben sich kaum Unterschiede innerhalb der Gruppen.

Es muss jedoch beachtet werden, dass nach der Unterteilung die Anzahl der Proben pro Gruppe sehr klein ist, besonders wenn noch zusätzlich zwischen gebürsteten und ungebürsteten Proben unterschieden wird.

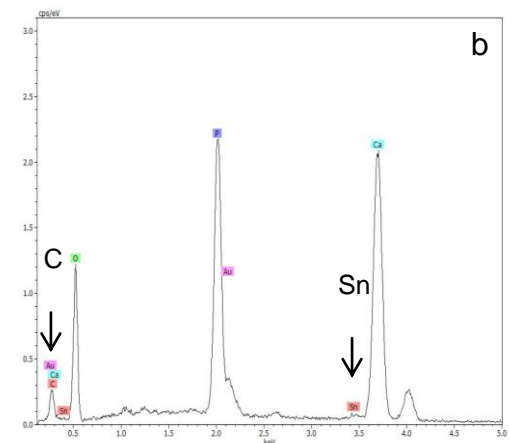
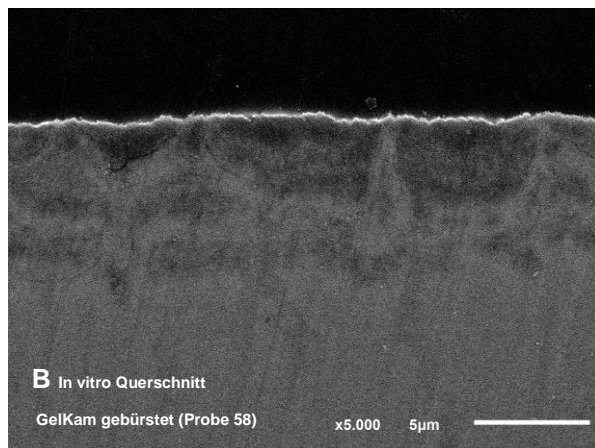
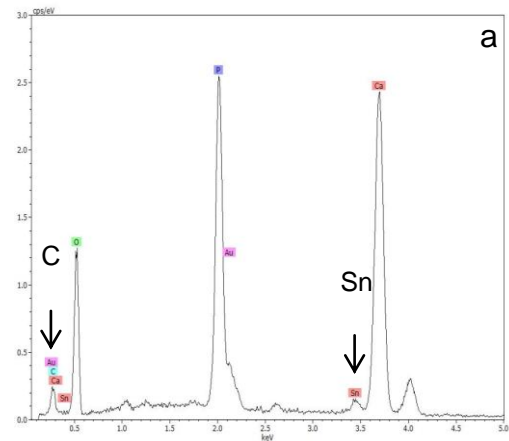
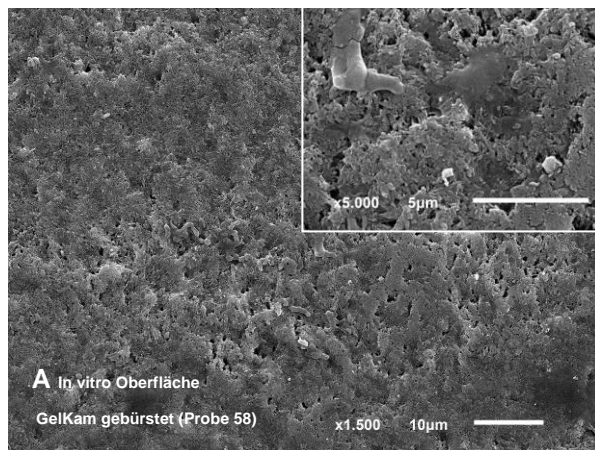


I

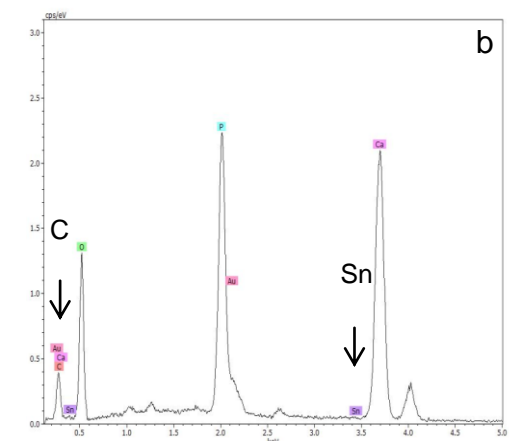
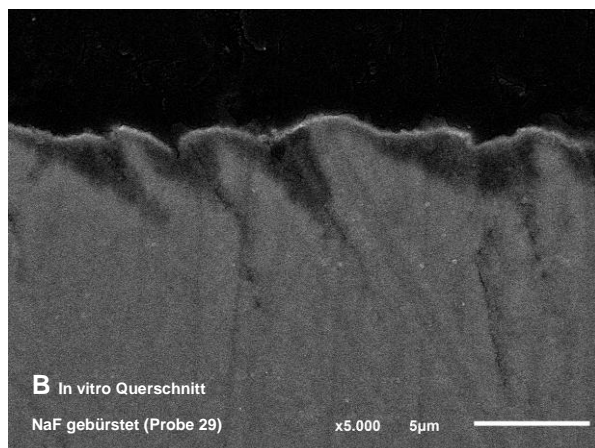
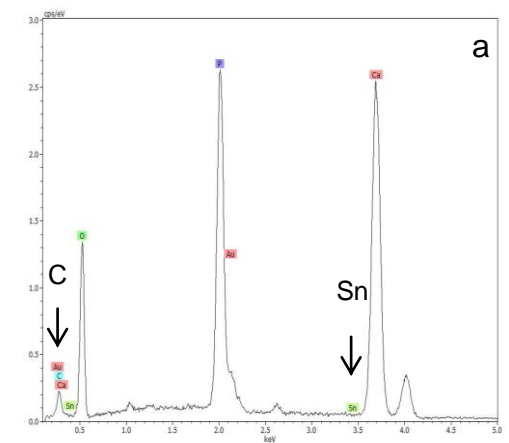
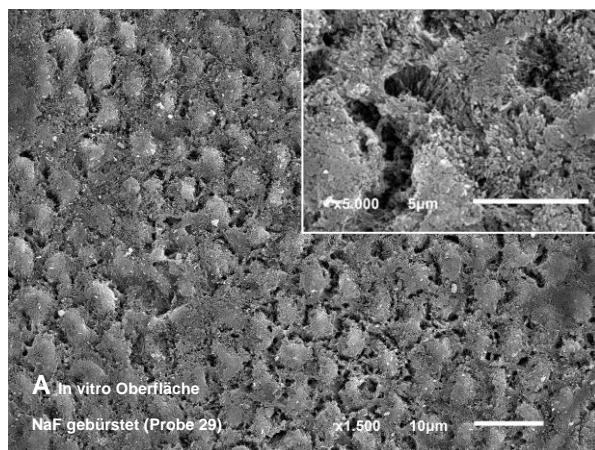


II





III



IV

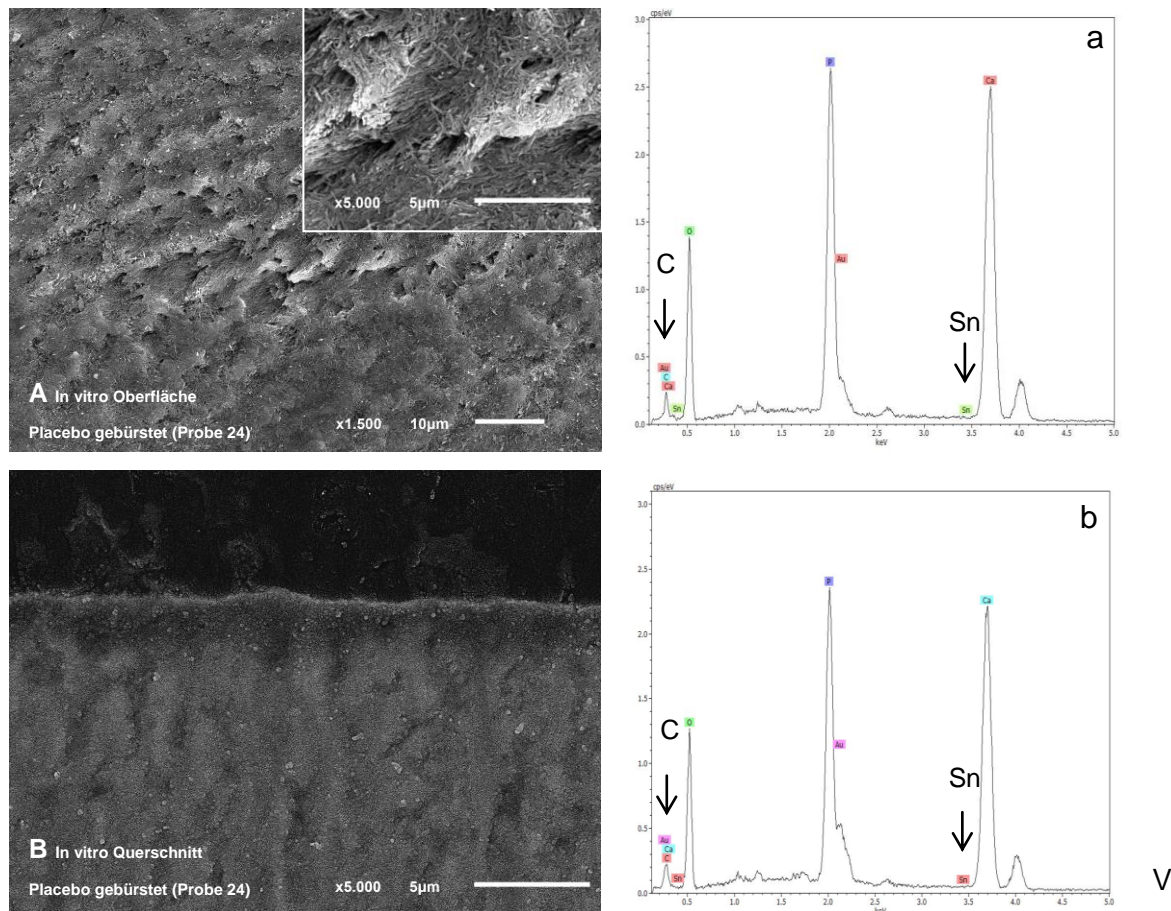
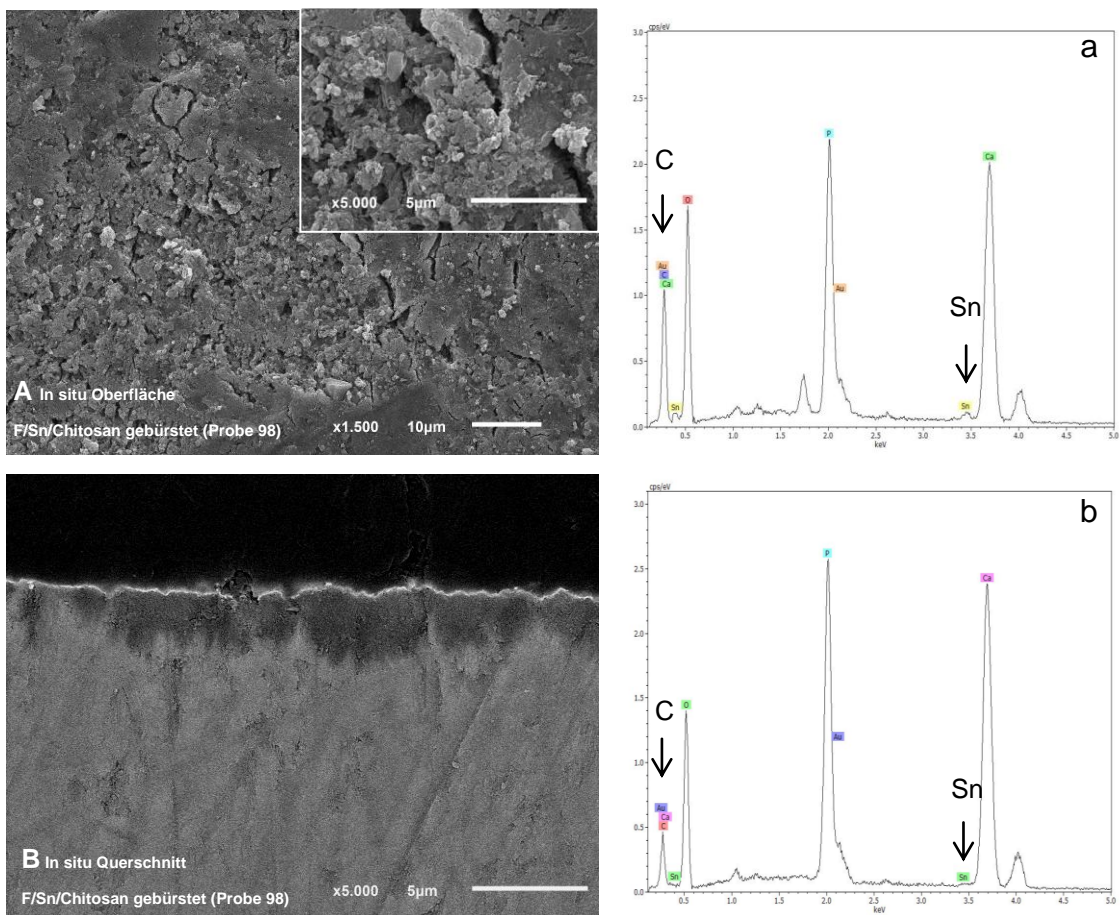
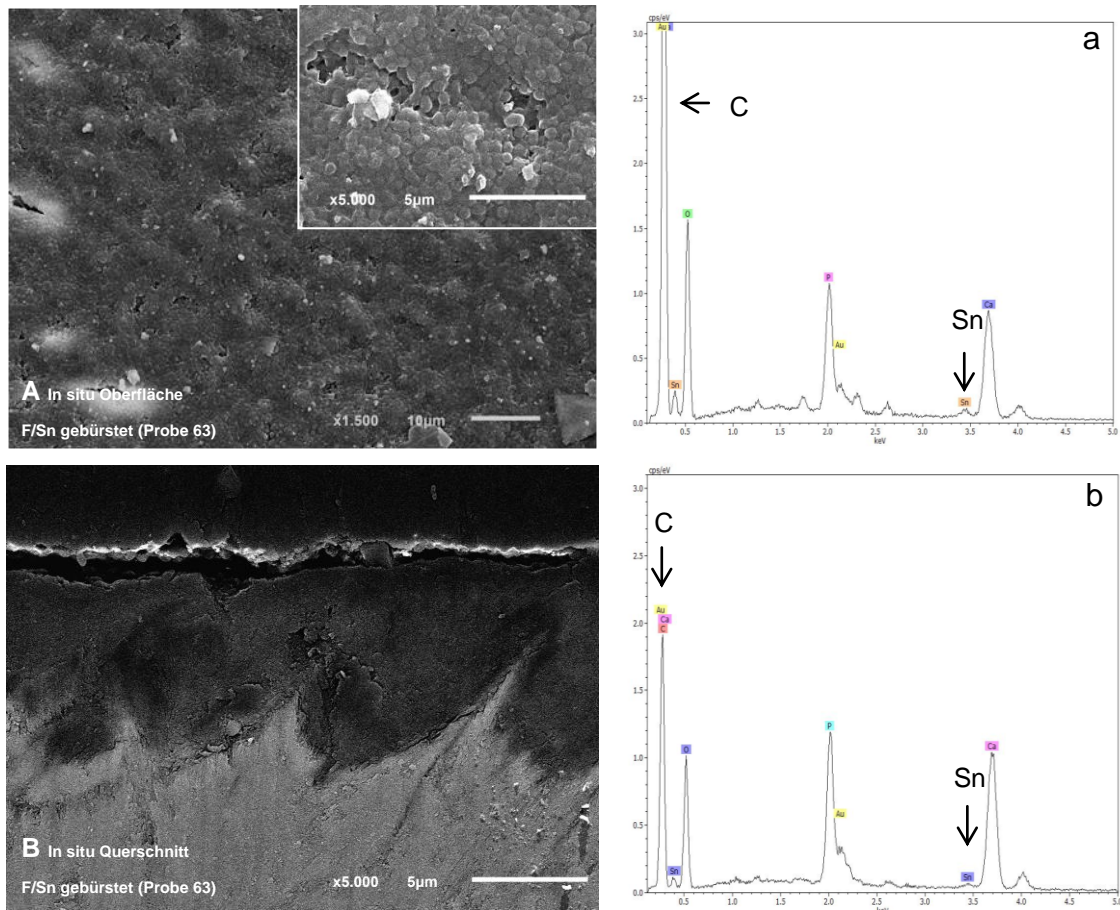
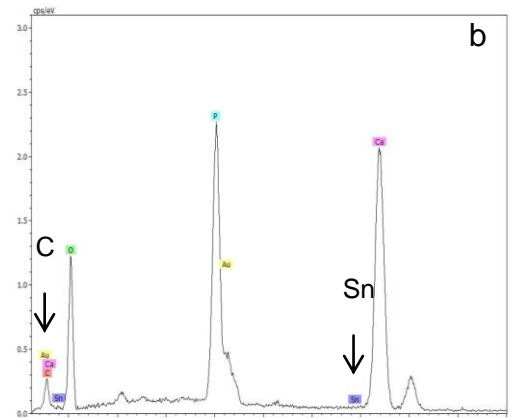
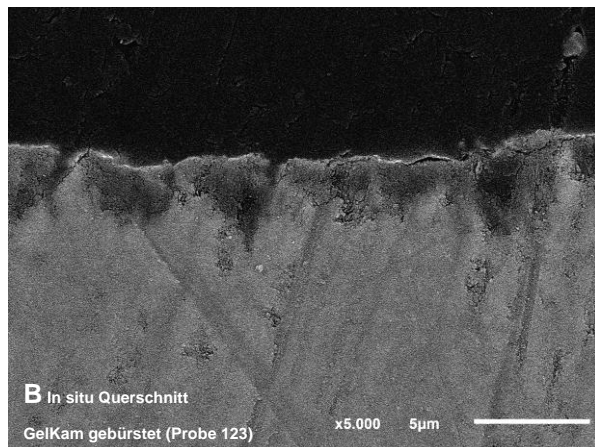
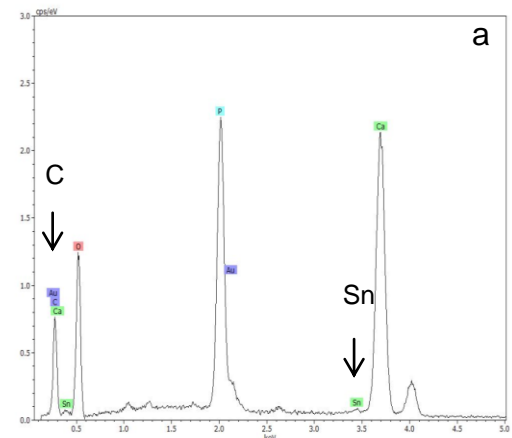
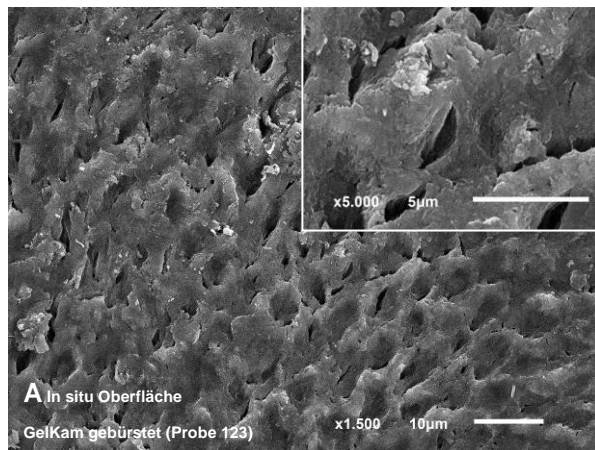


Abbildung 6: Repräsentative Bilder der verschiedenen Gruppen (I: F/Sn; II: F/Sn/Chitosan; III: GelKam; IV: NaF; V: Placebo) der qualitativen Strukturanalyse von gebürsteten Proben der in vitro Studie. A zeigt die jeweilige Probenoberfläche bei 1500facher Vergrößerung, beziehungsweise bei 5000facher Vergrößerung (kleines Bild). Es sind die zuvor definierten Strukturmerkmale wie glatte, beziehungsweise raue Oberfläche, Ätzmuster, Präzipitate, Krusten Schollen und Schleifspuren zu erkennen, wobei deutlich wird, dass nur geringe Unterschiede zwischen den Gruppen auftraten. B zeigt dieselbe Probe im Querschnitt bei 5000facher Vergrößerung. Dort ist unter der Oberfläche ein unterschiedlich breites Band einer veränderten Zone auszumachen. Die korrespondierenden Kleinbuchstaben zeigen den zugehörigen EDX-Schrieb. Markiert sind die Peaks für Kohlenstoff (C) und Zinn (Sn).

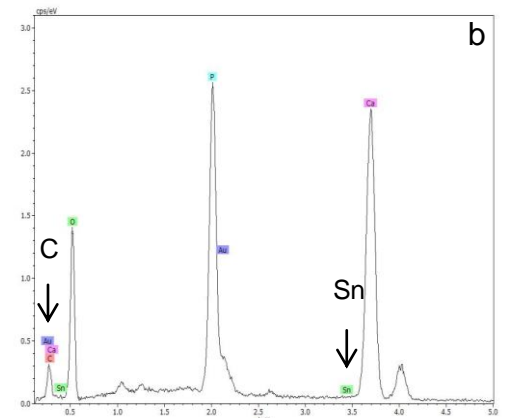
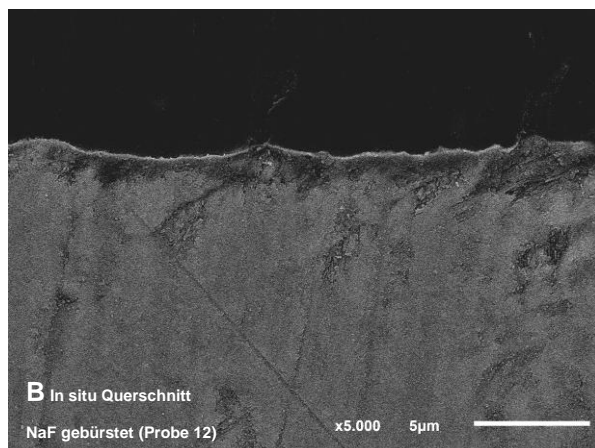
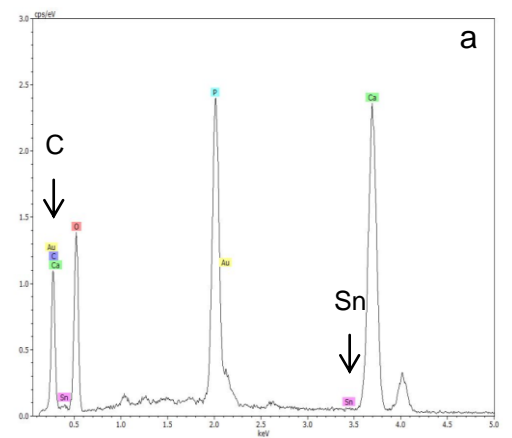
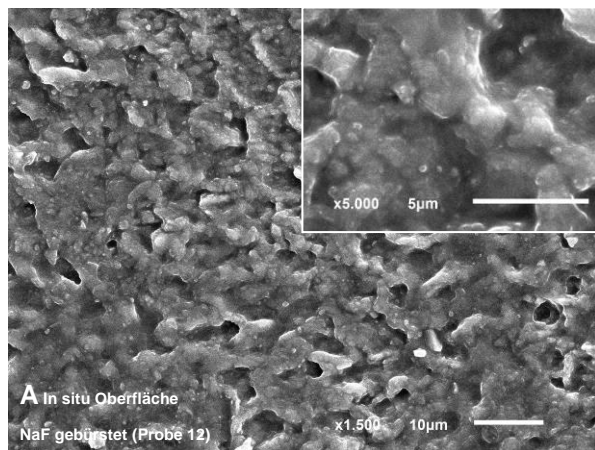








III



IV

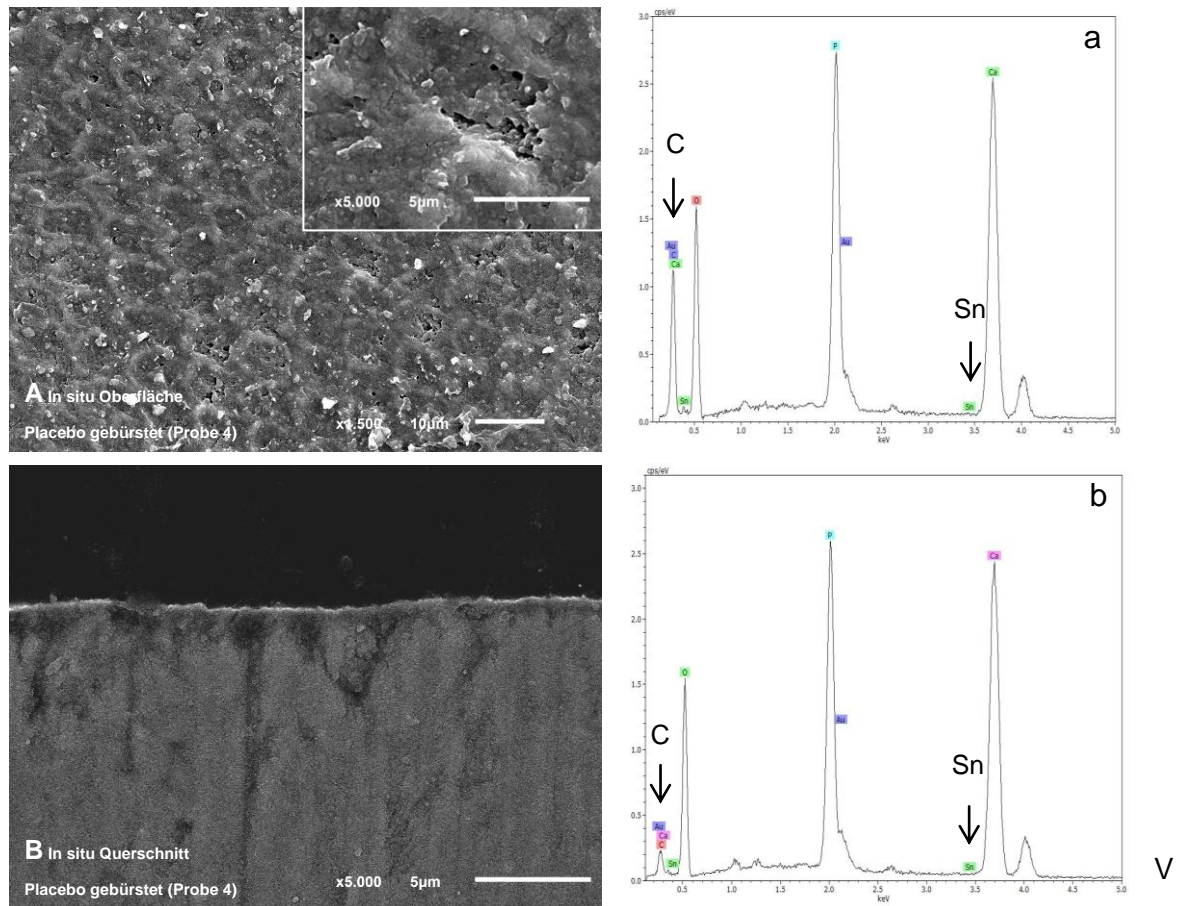
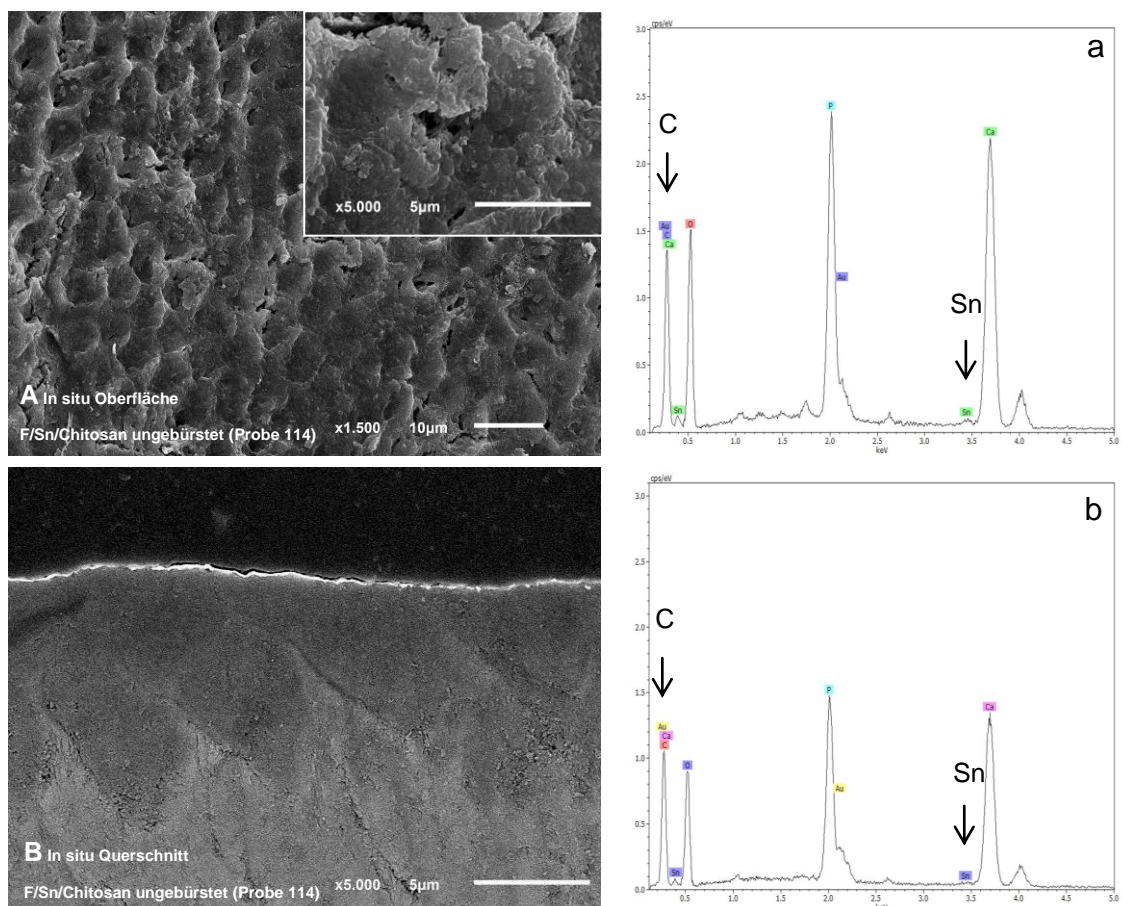
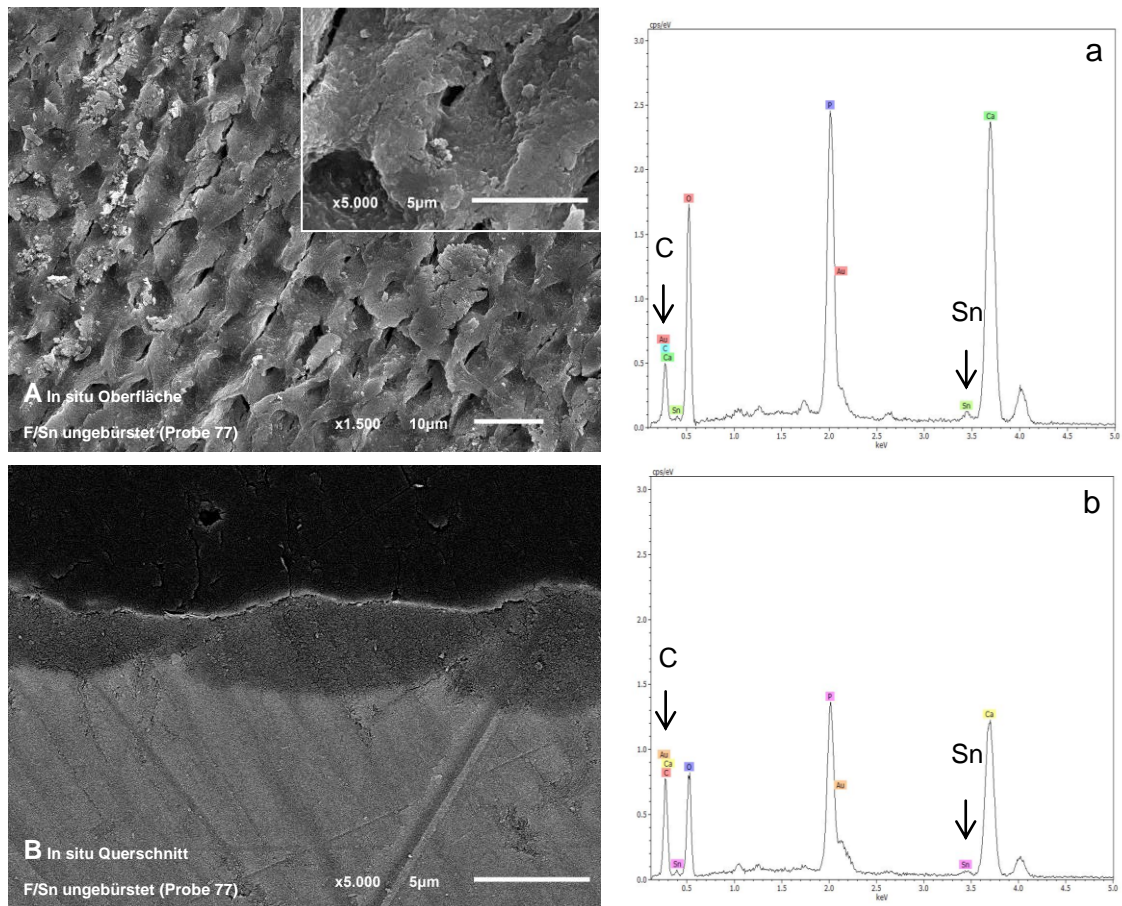
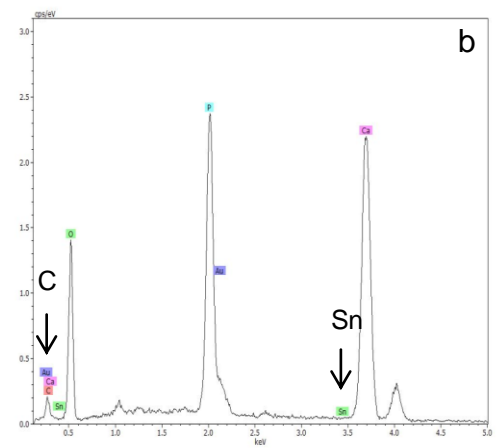
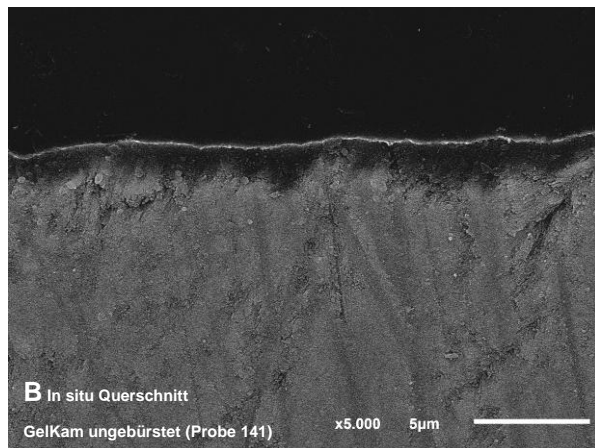
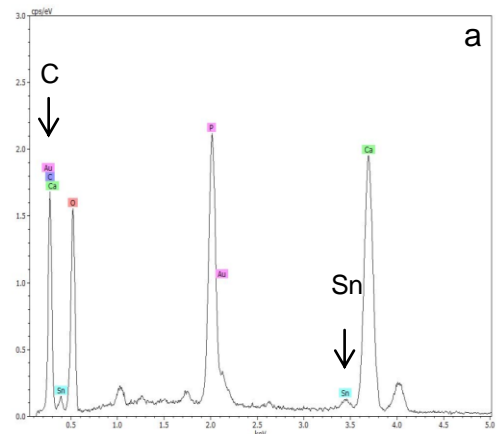
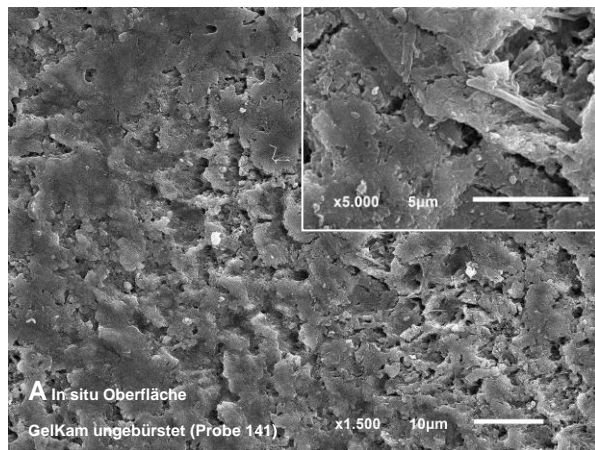


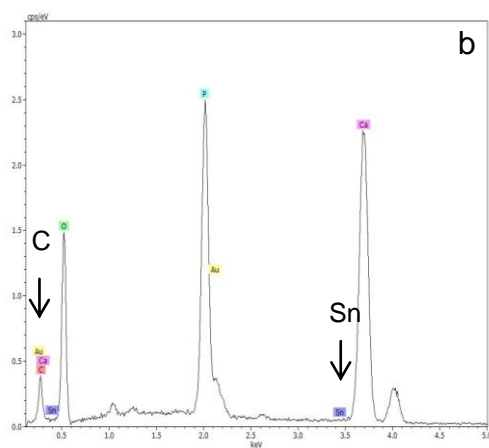
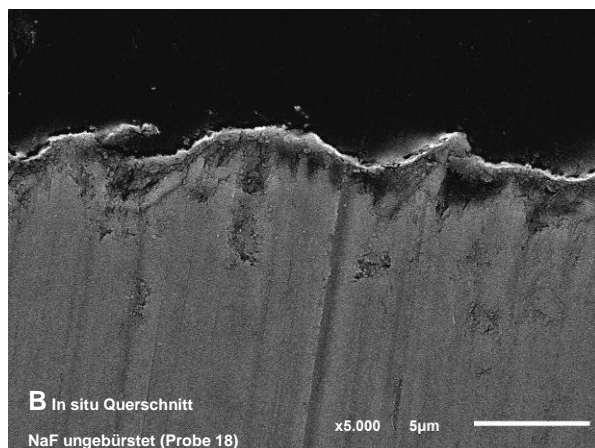
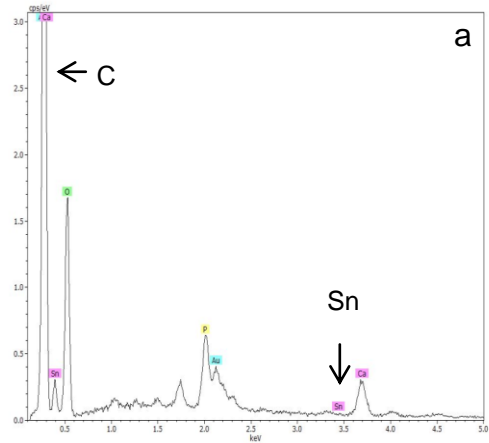
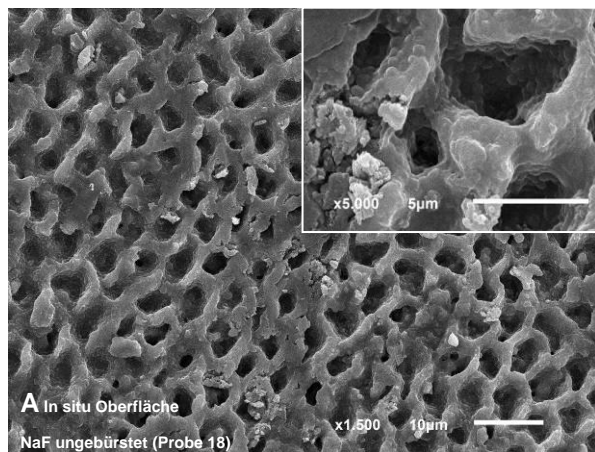
Abbildung 7: Repräsentative Bilder der verschiedenen Gruppen (I: F/Sn; II: F/Sn/Chitosan; III: GelKam; IV: NaF; V: Placebo) der qualitativen Strukturanalyse von gebürsteten Proben der in situ Studie. A zeigt die jeweilige Probenoberfläche bei 1500facher Vergrößerung, beziehungsweise bei 5000facher Vergrößerung (kleines Bild). Es sind die zuvor definierten Strukturmerkmale wie glatte, beziehungsweise raue Oberfläche, Ätzmuster, Präzipitate, Krusten Schollen und Schleifspuren zu erkennen, wobei deutlich wird, dass nur geringe Unterschiede zwischen den Gruppen auftraten. B zeigt dieselbe Probe im Querschnitt bei 5000facher Vergrößerung. Dort ist unter der Oberfläche ein unterschiedlich breites Band einer veränderten Zone auszumachen. Die korrespondierenden Kleinbuchstaben zeigen den zugehörigen EDX-Schrieb. Markiert sind die Peaks für Kohlenstoff (C) und Zinn (Sn). Dabei sind die teilweise sehr hohen Kohlenstoffpeaks zu erkennen.







III



IV



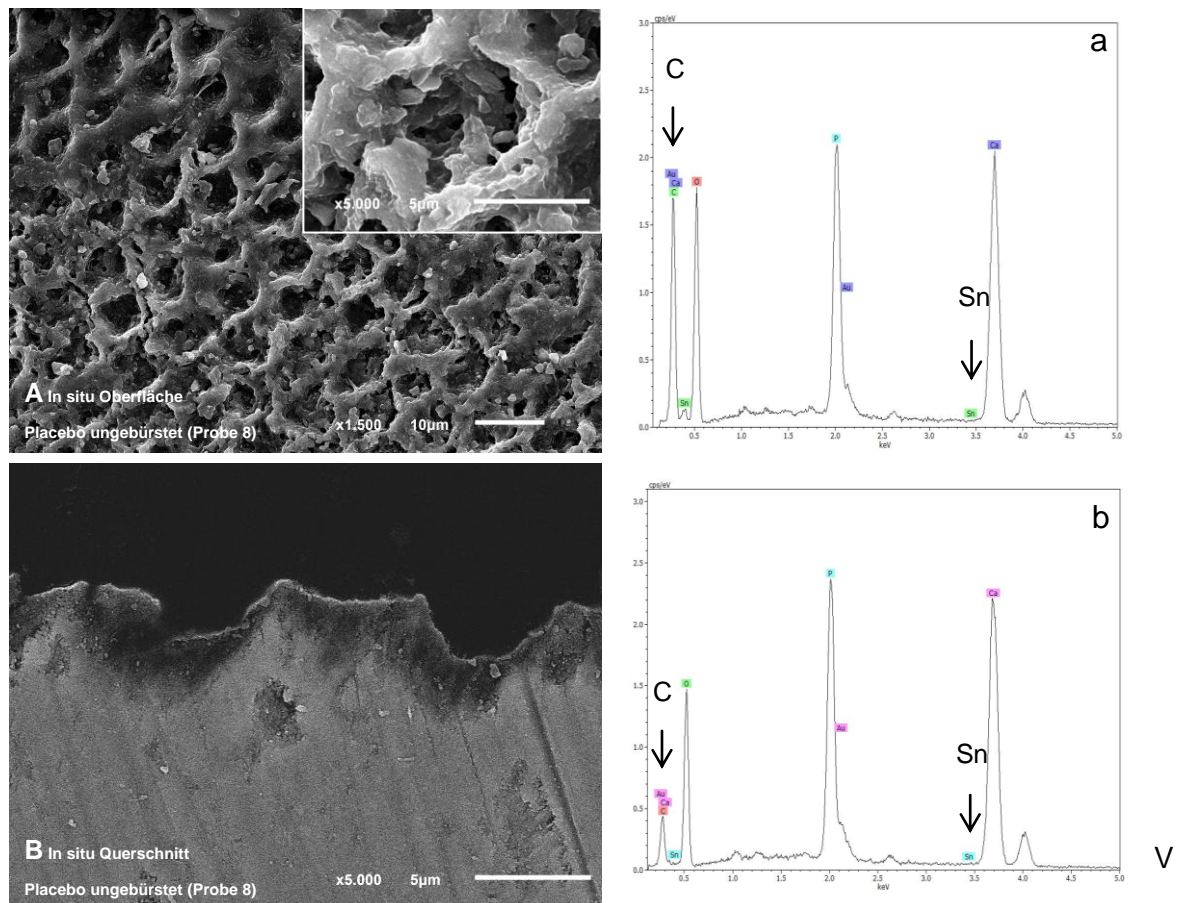


Abbildung 8: Repräsentative Bilder der verschiedenen Gruppen (I: F/Sn; II: F/Sn/Chitosan; III: GelKam; IV: NaF; V: Placebo) der qualitativen Strukturanalyse von ungebürsteten Proben der in situ Studie. A zeigt die jeweilige Probenoberfläche bei 1500facher Vergrößerung, beziehungsweise bei 5000facher Vergrößerung (kleines Bild). Es sind die zuvor definierten Strukturmerkmale wie glatte, beziehungsweise raue Oberfläche, Ätzmuster, Präzipitate, Krusten Schollen und Schleifspuren zu erkennen, wobei deutlich wird, dass nur geringe Unterschiede zwischen den Gruppen auftraten. B zeigt dieselbe Probe im Querschnitt bei 5000facher Vergrößerung. Dort ist unterhalb der Oberfläche ein unterschiedlich breites Band einer veränderten Zone auszumachen. Die korrespondierenden Kleinbuchstaben zeigen den zugehörigen EDX-Schrieb. Markiert sind die Peaks für Kohlenstoff (C) und Zinn (Sn). Dabei sind die teilweise sehr hohen Kohlenstoffpeaks zu erkennen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Versuchsaufbau

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Schmelzproben stammen ausschließlich von dritten Molaren, die vollständig retiniert waren. So konnte sichergestellt werden, dass die Zähne keinen Einflüssen der Mundhöhle ausgesetzt waren und es nicht zu einer exogenen Anreicherung von Mineralien, wie beispielsweise Fluorid oder Zinn kommen konnte. Nach dem Zahndurchbruch kann es durch Veränderung des Mineralgehaltes zu einer individuellen Veränderung der Säurelöslichkeit kommen [Driessens et al., 1985]. Die verwendeten Zähne wurden sorgfältig ausgewählt und die Proben, die aus einem Zahn gewonnen wurden, wurden zufällig auf die unterschiedlichen Studien und Gruppen verteilt. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass es nicht zu einer Beeinflussung der Ergebnisse durch unterschiedliche Säurelöslichkeit beziehungsweise strukturelle Unterschiede der Proben kommen konnte.

Zur Erzeugung einer Messfläche musste eine plane Oberfläche geschaffen werden. Durch das Beschleifen der Proben wurde die natürliche prismenfreie Zahnoberfläche entfernt, welche im Vergleich zu prismatischem Schmelz weniger säurelöslich ist [Meurman und Frank, 1991]. Somit können die gemessenen Werte der Oberflächenrauigkeit eventuell höher sein als sie unter natürlichen Bedingungen auftreten würden. Im natürlichen Gebiss wird jedoch die Schmelzoberfläche durch Vorgänge wie Attrition, Abrasion und vorangegangene Erosionen im Laufe des Lebens abgetragen. Durch diese Vorschädigung ist der Schmelz anfällig und kann bei Erosionspatienten zu einem höheren Maß an Erosion führen [Lussi et al., 1991]. Daher sind die verwendeten bearbeiteten Schmelzproben mit der natürlichen Zahnoberfläche von Erosionspatienten vergleichbar [Attin et al., 1996].

Zur Erzeugung der erosiven Demineralisation wurde 0,5%ige Zitronensäure genutzt, um eine extrinsische Säurezufuhr zu imitieren. Als Säurelieferanten können sowohl Softdrinks oder andere Getränke mit erosivem Potential als auch einfache Säuren genutzt werden. In der Literatur wurden oft Erfrischungsgetränke oder saure Fruchtsäfte zur Erzeugung von Erosionen genutzt [Meurman et al., 1990; Grenby et al., 1989; Schweizer-Hirt et al., 1978; Reussner et al., 1975; Davis und Winter, 1980]. Diese Getränke stellen zwar eine realistische Situation dar, variieren aber oft bei unterschiedlichen Chargen und enthalten zudem Zusatzstoffe, welche die Pellikel beeinflussen können. Einfache Säuren bieten die Möglichkeit einer besseren Standardisierung und die Versuche lassen sich gut reproduzieren. [Shellis et al., 2011].

Zitronensäure ist eine häufig in Lebensmitteln vorkommende Säure, sodass sie besonders gut geeignet ist, exogene Erosionen zu simulieren [West et al., 2001].

Die erosive Demineralisation erfolgte sechsmal am Tag für zwei Minuten. Die Häufigkeit und Dauer der Demineralisation entspricht der Aufnahme von drei Haupt- und drei Nebenmahlzeiten mit erosivem Potential. Es konnte belegt werden, dass Patienten, die schwere Erosionen aufweisen, mehrmals täglich erosive Nahrungsmittel zu sich nehmen. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass das Erosionsrisiko um das 37fache erhöht sein kann, wenn mehr als zweimal pro Tag erosive Nahrungsmittel verzehrt werden und noch weitere Risikofaktoren, wie z.B. ein verringerter Speichelfluss vorliegen [Järvinen et al., 1991]. Auch eine Studie an 130 Rohköstlern zeigte, dass es bei dieser Ernährungsform zu einer maximalen Aufnahme von 96% (Durchschnitt 62%) Obstanteil in der Nahrung kommen kann. Die Häufigkeit der Einnahme von sauren Mahlzeiten kann dabei bis zu 16 Mal (Durchschnitt 4,8) am Tag betragen [Ganss et al., 1999]. Somit sind Dauer und Häufigkeit der Demineralisation im Versuchsaufbau als realistisch für Personen mit hohem Erosionsrisiko einzustufen. Zudem wurden in ähnlichen Studien der Arbeitsgruppe die gleichen Zeiten gewählt, was Vergleiche der Studien untereinander zulässt [Ganss et al., 2012; Ganss et al., 2011].

Die Abrasionserzeugung erfolgte in den in vitro Studien mittels eines Bürstapparates mit einem Auflagegewicht von 200 g für 15 Sekunden. Der Anpressdruck der Bürste, der bei einem Auflagegewicht von 200 g entsteht, entspricht in etwa dem durchschnittlichen Putzdruck von Probanden [Ganss et al., 2009] und wird für in vitro Versuche empfohlen. In den in situ Studien wurde mit einer elektrischen Zahnbürste zweimal täglich mit 2,5 N für 5 Sekunden pro Probe gebürstet. Dies entspricht etwa einer Gesamtzahnputzzeit von 2 Minuten, wobei jeder Quadrant etwa 30 Sekunden gebürstet wird. Diese Zeit spiegelt eine realistische Putzzeit im Alltag wider und wird für in situ Versuche empfohlen [Wiegand und Attin, 2011].

Um die Wirksamkeit der experimentellen Pasten einordnen zu können, musste für die durchgeführten Versuche ein Referenzprodukt als Positivkontrolle gewählt werden.

Es stellt sich prinzipiell als schwierig dar, für Zahnpasten eine Richtlinie und somit eine Positivkontrolle festzulegen, da sich Zahnpasten durch ihre vielen Zusatzstoffe wie Stabilisatoren, Verdickungsmittel, Konservierungsstoffe und Abrasiva in ihrer Zusammensetzung stark unterscheiden.

Als Positivkontrolle wurde für die vorliegende Arbeit ein zinnfluoridhaltiges Gel (Colgate® GelKam®) ausgewählt. Es enthält in etwa die gleiche Menge an Zinn wie die experimentellen Pasten, ist jedoch keine Zahnpaste im eigentlichen Sinn, da es

eine einfachere Zusammensetzung ohne Abrasiva und andere Zusatzstoffe aufweist. Somit kann die Untersuchung des Reaktionsmechanismus von Zinn mit der Zahnoberfläche ohne Beeinflussung von anderen Inhaltsstoffen der Zahnpasten wie z.B. Abrasiva und Stabilisatoren erfolgen. Diese können die Verfügbarkeit der Zinnionen beeinflussen. Zudem wurde dieses Produkt in der Arbeitsgruppe schon in anderen Studien als Positivkontrolle verwendet und erlaubt damit einen Vergleich der Studien.

### 4.2 Messmethoden

Die Bestimmung der Oberflächenrauigkeit erfolgte, um Veränderungen in der Oberflächenstruktur der Schmelzproben durch erosive Demineralisation und die anschließende Behandlung mit verschiedenen Zahnpasten mit beziehungsweise ohne Bürsten zu untersuchen.

Zur Messung der Oberflächenrauigkeit wurde ein optisches Profilometer eingesetzt. Die Oberflächenprofilometrie beschreibt den Verlust an Zahnhartsubstanz im Vergleich zu einer Referenzfläche und liefert außerdem Informationen über die Rauigkeit der Oberfläche wobei meist der Mittenrauwert (Ra) erfasst wird [Field et al., 2010]. Um mittels Profilometrie ein zwei- oder dreidimensionales Profil der Oberfläche zu erstellen kann ein mechanischer Taster oder ein optischer Sensor genutzt werden.

Kontaktsensoren bestehen aus einem Fühler mit einer Spitze aus Diamant oder Stahl. Der Nachteil dieses Systems besteht darin, dass die verwendeten Taster die Oberfläche berühren und eventuell beschädigen und so das Messergebnis beeinflussen können [Schlueter et al., 2011]. Außerdem kann die taktile Messung durch eine mögliche Ablagerung von Präzipitaten auf der Oberfläche beeinflusst werden. Für die vorliegende Arbeit wurde daher eine optische Methode mit einem Sensor mit chromatisch aufgefächertem Licht genutzt. Dabei berührt der Messkopf die Probenoberfläche nicht und vermeidet somit eine Beschädigung derselben. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Sensor weist mit einer vertikale Auflösung von 10 nm und einer lateralen Auflösung von 1-2  $\mu\text{m}$  eine hohe Messgenauigkeit auf.

Zur quantitativen Elementanalyse und somit zur Bestimmung des Zinngehaltes auf den Oberflächen und in den Querschnitten der Proben wurde die energiedispersive Röntgenanalyse (EDX) genutzt. Es existieren zwei gängige Verfahren zur Elementquantifizierung, die wellenlängendispersive Röntgenanalyse (WDX) und die energiedispersive Röntgenanalyse (EDX). Ein WDX-Detektor wird auf die spezifische Wellenlänge eines Elementes ausgerichtet und kann so durch die für ein Element



spezifische, von der Probe zurückgeworfene Röntgenstrahlung alle Elemente mit einer Ordnungszahl von mindestens vier detektieren. Bei dieser Methode kann während einer Messung jeweils nur ein Element quantifiziert werden. Dafür kann durch WDX eine höhere Nachweisempfindlichkeit (0,01 Gewichtsprozent) und eine höhere spektrale Auflösung des Röntgenspektrums erreicht werden. Die Nachweisempfindlichkeit eines EDX-Detektors ist eine 10er Potenz niedriger (0,1 Gewichtsprozent). Der Vorteil des in der vorliegenden Arbeit verwendeten EDX-Verfahrens liegt darin, dass ein EDX-Detektor gleichzeitig das gesamte Röntgenspektrum und somit alle Elemente analysieren kann. Dies ist besonders für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten „Reihenmessungen“ von Vorteil. Die etwas niedrigere Nachweisempfindlichkeit des EDX-Detektors war für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit ausreichend, da das Hauptaugenmerk auf die relative Verteilung der unterschiedlichen Elemente gelegt wurde.

Während der EDX-Analyse wurden Variablen wie Beschleunigungsspannung, Emmissionsstrom, Spot-Größe, Scan-Modus und Aufnahmewinkel immer konstant gehalten. Auch Aufnahmezeit und Vergrößerung waren bei allen Messungen gleich um eine Vergleichbarkeit der Werte untereinander zu gewährleisten.

Zur Auswertung der Spektren wurde ein standardfreies Quantifizierungsverfahren verwendet. Im Gegensatz zu einem Verfahren, welches ein Standard als Vergleich verwendet, erlaubt es nur eine relative Bestimmung der auf der Probe enthaltenen Elemente. Wenn dabei die wichtigsten Elemente quantifiziert werden, kann eine Näherung an den „wahren“ Wert erreicht werden. Dieses Verfahren war für die Fragestellung der Arbeit ausreichend.

## 4.3 Ergebnisse

### 4.3.1 Rauheitswerte

Durch die Bestimmung der Oberflächenrauigkeit kann anhand der topographischen Variablen eine Aussage über die Gleichmäßigkeit und Glätte der Oberfläche gemacht werden. Es werden Gipfel und Mulden auf der Oberfläche gemessen und anhand dessen können erosiv, beziehungsweise erosiv/abrasiv bedingte potentielle Veränderungen auf der Oberfläche gezeigt werden.

In einer in vitro Studie an bovinem Schmelz wurde deutlich, dass sich die Oberflächenrauigkeit nach Kontakt der Proben mit säurehaltigen Getränken vergrößert. Mit Hilfe von optischer 3D Mikroskopie wurde nach Erzeugung der Erosionen mit Cola nach einer Minute ein Ra-Wert von 22,7 nm und nach 60 Minuten ein Wert von 84,7 nm (Kontrolle Ra = 15,4 nm) gemessen. Nach Verwendung von Orangensaft änderte sich der Kontrollwert von Ra = 17,3 nm auf 22,0 nm nach einer Minute und 61,4 nm nach 60 Minuten [Fujii et al., 2011]. Diese Werte sind um den Faktor 5-10 geringer als die gemessenen Ra- Werte der vorliegenden Studie. Dies könnte sich durch die einmalige Demineralisation in oben genannter Studie erklären. In der vorliegenden Arbeit wurden die Proben über einen Zeitraum von 10 Tagen täglich jeweils 6 x 2 Minuten in Zitronensäure geschwenkt und anschließend remineralisiert.

Auch eine weitere in vitro Studie zeigte nach Behandlung von Schmelzproben mit Orangensaft (pH = 3,8) für 20 Minuten 5 x täglich über einen Zeitraum von 5 Tagen eine Vergrößerung der Oberflächenrauigkeit. Dabei wurde die flächenhafte Rauigkeit Sa bestimmt, wobei Sa vor der Behandlung 1,2 µm und nach der Behandlung mit Orangensaft 2,02 µm betrug. Im Vergleich dazu wurde die Rauigkeit nach Behandlung mit Wasser nicht größer (1,25 µm vor und 1,21 µm nach der Behandlung) [Ren et al., 2009]. Diese Werte bestätigen die Theorie, dass eine längere Demineralisation, beziehungsweise mehrere Behandlungen mit Säure pro Tag eine größere Rauigkeit hervorrufen. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich für die Placebogruppe eine flächenhafte Rauigkeit von 0,29 µm, also ein Wert um ca. den Faktor 10 geringer. Da in der zitierten Studie die Demineralisationszeit 20 Minuten betrug, also etwa 10 mal länger als in der vorliegenden Arbeit, sind die Werte dementsprechend gut vergleichbar. Es muss jedoch beachtet werden, dass die Werte Sa und Ra nicht unmittelbar miteinander vergleichbar sind.

Die Proben der in vitro Studie zeigten nach Bürsten mit den zinnhaltigen Präparaten tendenziell niedrigere Werte der Oberflächenrauigkeit als die Gruppen ohne Zinn.

Dabei zeigte GelKam signifikant niedrigere Werte als die zinnfreien Gruppen und auch als F/Sn/Chitosan.

Die geringere Oberflächenrauigkeit der in vitro Proben nach Verwendung von GelKam im Vergleich zu den anderen Zahnpasten könnte sich zum einen durch die einfachere Zusammensetzung des Gels erklären lassen. GelKam ist keine Zahnpaste im eigentlichen Sinn, da es kaum Zusatzstoffe und keine Abrasiva enthält. Abrasiva sind Putzkörper und werden Zahnpasten beigemischt, um eine Beseitigung von Ablagerungen zu erzielen. Dies können zum Beispiel Silica (Siliciumdioxid), Aluminiumoxid oder Calciumcarbonat sein. Es wurde gezeigt, dass Zahnpasten einen bestimmten Gehalt an Abrasivität benötigen, um einen Belag auf den Zähnen zu reduzieren [Dawson et al., 1998]. Diese Abrasivstoffe entfernen jedoch nicht nur Beläge, sondern können auch zu einem Abtrag der Zahnhartsubstanz führen. Die Abrasion der Zahnhartsubstanz muss also von zwei Seiten betrachtet werden. Zum einen verdeutlicht die Messung des Substanzverlustes den quantitativen Aspekt der Abrasivität. Zusätzlich ist es jedoch wichtig, auch den qualitativen Aspekt zu untersuchen, welcher zumindest nach einem erfolgten Säureeinfluss in einer Änderung der Oberflächenstruktur und somit in einer Veränderung der Rauigkeit besteht.

Bezüglich des Substanzverlustes muss zwischen gesundem und zuvor erodiertem Schmelz unterschieden werden.

Das Bürsten von gesunder Zahnhartsubstanz führt zu einem zu vernachlässigenden Substanzabtrag, sowohl von Schmelz als auch von Dentin [Addy und Hunter, 2003].

Für zuvor erodierten Schmelz hingegen konnte in einer in vitro Studie ein Zusammenhang zwischen Zahnhartsubstanzverlust und der Abrasivität der verwendeten Zahnpaste gezeigt werden. Es wurden verschiedene Zahnpastengemische mit unterschiedlich hohem REA (relative enamel abrasivity, relative Schmelzabrasivität) verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Abrasiva in Zahnpasten den Abtrag von Schmelz vergrößert, die Werte waren jedoch für mittlere und hohe REA Werte gleich [Wiegand et al., 2008].

In einer weiteren in vitro Studie wurden Schmelz- und Dentinproben einer zyklischen Demineralisation und Remineralisation ausgesetzt und zusätzlich gebürstet. Es wurden drei verschiedene Zahnpasten mit drei verschiedenen Abrasivitätsstufen verwendet. Auch hier wurde deutlich, dass mit höherer Abrasivität der Zahnpasten ein größerer Substanzverlust einherging [Hara et al., 2009].

Es ist also denkbar, dass abrasive Partikel in Zahnpasten nicht nur den Substanzverlust von erodierter Zahnhartsubstanz vergrößern, sondern auch zu einer Erhöhung der Rauigkeit führen können. Zwar konnte in einer in vitro Studie kein Zusammenhang zwischen RDA (relative dentin abrasion) und Rauigkeit verwendeter

Dentinproben gezeigt werden [Liljeborg et al., 2010], eine andere in vitro Studie zeigte jedoch, dass sich die Rauigkeit des Schmelzes nach Putzen mit abrasiven Zahnpasten erhöhte [Bolay et al., 2012]. Somit kann die geringere Oberflächenrauigkeit nach Verwendung des nicht abrasiven Gels durchaus erklärt werden.

Die Untersuchungen der in situ Proben ergaben keine Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich der Oberflächenrauigkeit. Eine Ursache dafür könnte die Pellikel sein, welche sich durch das Tragen der Proben im Mund auf den Schmelzoberflächen gebildet hat. Diese organische Schicht wurde in der vorliegenden Arbeit nicht entfernt, sodass sie bei den Rauigkeitsmessungen als Oberflächenstruktur gemessen wurde.

Die Pellikel führte zwar bei den in situ Proben zu einer Nivellierung der Oberfläche, es können jedoch die Werte der in situ und in vitro Studien untereinander verglichen werden. Dabei wird deutlich, dass es durch die Ablagerung der Pellikel auf den in situ Proben zu einer Erhöhung der Rauigkeit kam.

Es liegen derzeit keine vergleichbaren in situ Studien vor, zur Einordnung der Ergebnisse müssen daher Studien genannt werden, die unter Laborbedingungen durch künstliche Erzeugung einer Pellikel den in situ Bedingungen am nächsten kommen.

Eine in vitro Untersuchung an bovinem Schmelz zeigte eine Vergrößerung der Oberflächenrauigkeit Ra nach Behandlung der Proben mit 1%iger beziehungsweise 0,1%iger Zitronensäure. Die Hälfte der Proben wurde für 24 Stunden in einer Speichellösung aufbewahrt, um eine künstliche Pellikel zu formieren. Anschließend wurden die Proben für eine Minute mit der Säure in Kontakt gebracht. Die Oberflächenrauigkeit Ra bei gesundem, unbehandeltem Schmelz betrug 89,6 nm. Nach Behandlung mit der 0,1%igen Säure stieg der Wert um 18,4 nm, bei den mit Pellikel bedeckten Proben nur um 2,0 nm. Nach Behandlung mit der 1%igen Säure stieg Ra um 46,4 nm und bei den mit Pellikel bedeckten Proben um 10,0 nm [Nekrashevych und Stösser, 2003]. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Zahnhartsubstanzoberfläche durch die Anwesenheit der Pellikel beeinflusst wurde. Anders als in der vorliegenden Arbeit waren die Rauigkeitswerte der mit Pellikel bedeckten Proben jedoch geringer als die der Proben ohne Pellikel.

Auch in einer weiteren in vitro Studie wurde der Einfluss der Pellikel auf Erosionsvorgänge untersucht. Dazu wurde durch gesammelten menschlichen Speichel eine Pellikelbildung induziert. Die Schmelzproben wurden in vier Gruppen eingeteilt und dann in acht Zyklen zuerst in der Speichellösung (zwei Gruppen), einer Remineralisationslösung, beziehungsweise einer feuchten Kammer (Kontrollgruppe) aufbewahrt und anschließend für jeweils eine Minute in Zitronensäure (pH = 3,6) demineralisiert. Nach jedem Zyklus wurden optische Messungen durchgeführt. Bei

einer der Gruppen, die in Speichel remineralisiert wurden, wurde die Pellikel vor den Messungen mittels einer NaOH-Lösung entfernt. Die Ergebnisse zeigten eine Beeinflussung der Messungen durch die Pellikel. Durch die organische Schicht auf der Oberfläche waren zum Beispiel die Rauigkeitswerte niedriger als erwartet. Dabei zeigte sich, dass nach Entfernung der Pellikel eine signifikant niedrigere optische Reflektion, das heißt, dass eine höhere Rauigkeit, gemessen wurde [Lussi et al., 2012]. In der zitierten Studie wurde, wie in der vorliegenden Arbeit, ein optisches Verfahren zur Messung der Rauigkeit verwendet und es kam durch Ablagerungen von organischen Substanzen auf der Oberfläche zu einer Beeinflussung der Messergebnisse. Die genannten Studien zeigten eine geringere Rauigkeit durch die Anwesenheit der Pellikel, während in der vorliegenden Arbeit die in situ Proben höhere Rauigkeitswerte aufwiesen als die in vitro Proben. Die Ursache hierfür ist bisher jedoch noch unklar. Eine mögliche Erklärung könnte der gepoolte ex-vivo Speichel sein, der in der genannten Studie verwendet wurde. Es wäre denkbar, dass dieser Speichel, auch durch vorangegangene Manipulation (Zentrifugation, Einfrieren, Auftauen), andere Eigenschaften aufweist als der in-vivo Speichel der Studie, aus der in der vorliegenden Arbeit Proben untersucht wurden.

Es wird also deutlich, dass die Pellikel auf die Rauigkeitswerte Einfluss nimmt. Es zeigten sich sowohl höhere, als auch niedrigere Werte als bei den Vergleichsproben. In der vorliegenden Studie zeigte sich, dass trotz unterschiedlicher Behandlungen (Erosion bzw. Erosion/Abrasion) nur ein geringer Unterschied der Rauigkeit zwischen den in situ Proben zu messen war. Um die Art der Beeinflussung besser definieren zu können, sind weitere Studien nötig.

Ob durch die Anwesenheit unterschiedlicher Präzipitate auf der Oberfläche eine weitere Beeinflussung der Rauigkeit sowohl unter in vitro, als auch unter in situ Bedingungen erfolgte, konnte nicht abschließend geklärt werden. Wie in der Strukturanalyse deutlich wird, zeigten sich auf den meisten Proben Präzipitate (in vitro 75%, in situ 100%, in situ nach zusätzlicher Erosion 80%). Diese unterschieden sich zwar in ihrem Aussehen, die unterschiedlichen Formen beeinflussten die Rauigkeit jedoch nicht. Da nahezu alle Proben Präzipitate in irgendeiner Form zeigten, konnte jedoch auch nicht gezeigt werden, dass ohne deren Anwesenheit eine geringere Rauigkeit vorgelegen hätte. Weitere Studien sind nötig, um die Beschaffenheit der Präzipitate zu untersuchen und deren Einfluss auf die Rauigkeit der Oberfläche zu zeigen.

#### 4.3.2 Zinnretention

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Untersuchung des genauen Wirkungsmechanismus der zinnhaltigen Zahnpasten. Die antierosive Wirksamkeit dieser Produkte auch im Vergleich zu NaF-haltigen Produkten konnte bereits gezeigt werden [Ganss et al., 2012; Young et al., 2006; Schlueter et al., 2013a].

So zeigte sich in der in vitro Studie, aus denen ein Teil der Proben für die vorliegende Arbeit stammen, eine Reduktion des Substanzverlustes für F/Sn um 38%, für F/Sn/Chitosan um 65% und für GelKam um 77%, verglichen mit der Kontrollgruppe [Ganss et al., 2012]. Auch in anderen Studien konnte eine bessere Effektivität von zinnhaltigen Produkten gezeigt werden [Young et al., 2006].

Eine in vivo Studie, bei der Oberkieferfrontzähne von 20 Probanden zuerst mit Zitronensäure demineralisiert und anschließend mit einer natriumfluoridhaltigen oder einer zinnfluoridhaltigen Zahnpaste behandelt wurden, wies eine signifikante Verringerung der Löslichkeit der Schmelzoberfläche nach Verwendung der zinnfluoridhaltigen Zahnpaste (20% Reduktion) im Vergleich zur natriumfluoridhaltigen Zahnpaste auf (keine Reduktion) [Young et al., 2006].

Ebenso konnten die beiden in situ Studien, aus denen die Proben für die vorliegende Arbeit stammen, positive Ergebnisse hinsichtlich einer Reduktion des Substanzverlustes durch zinnhaltige Produkte zeigen [Schlueter et al., 2013a; Schlueter et al., 2013b]. Die Reduktion des Substanzverlustes nach Behandlung mit den Zahnpasten ohne Bürsten, verglichen mit der Placebopaste, betrug für F/Sn 68%, für F/Sn/Chitosan 76% und für GelKam 82%. Wurden die Proben zusätzlich noch gebürstet, zeigte sich eine verringerte Reduktion des Substanzverlustes von 27% für F/Sn, 46% für F/Sn/Chitosan und 69% für GelKam, verglichen mit der Placebopaste.

Dies zeigt, dass die vielversprechenden Ergebnisse durch das Bürsten etwas abgeschwächt werden, es wird jedoch trotzdem deutlich, dass das Gel den geringsten Substanzverlust erzielen konnte. Aber auch die experimentelle chitosanhaltige Zahnpaste zeigte einen signifikant geringeren Wert als die Placebopaste und auch als die zinnhaltige Paste ohne Chitosan [Schlueter et al., 2013a].

Abbildung 8 zeigt die prozentuale Reduktion des Substanzverlustes der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Pasten, die in den oben genannten in vitro und in situ Untersuchungen gemessen wurden [Ganss et al., 2012; Schlueter et al., 2013a; Schlueter et al., 2013b].

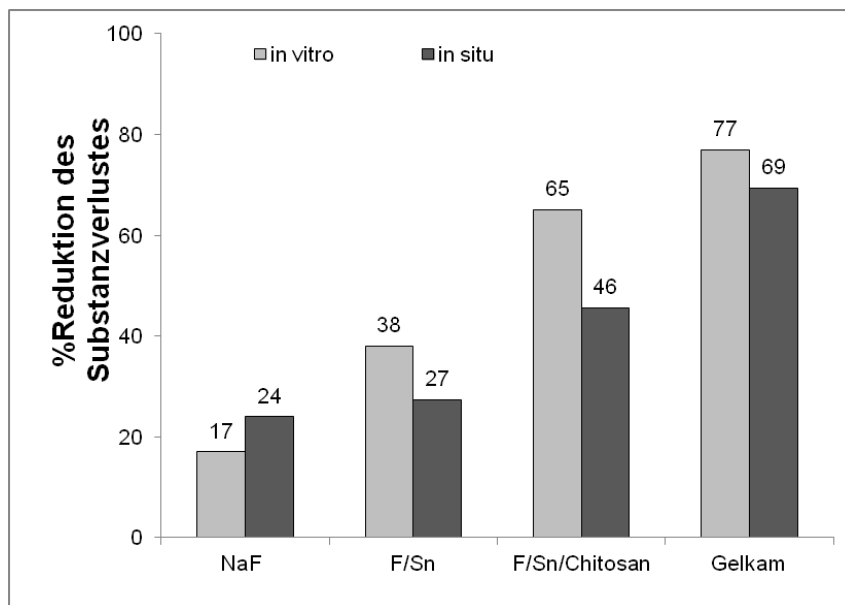


Abbildung 8: Prozentuale Reduktion der Substanzverlustwerte (%) im Vergleich zu der jeweiligen Placebopaste nach Verwendung der verschiedenen Zahnpasten unter in vitro (hellgrau) und in situ Bedingungen (dunkelgrau). Die Proben wurden zyklisch demineralisiert (6 x 2 min pro Tag, 0,5%ige Zitronensäure), intermittierend in Speichel (in situ) oder gesättigter Ca/P-Lösung (in vitro) gelagert und zweimal täglich gebürstet [Schlueter et al., 2013a; Schlueter et al., 2013b; Ganss et al., 2012]

Während also die Effektivität bereits gezeigt werden konnte, lagen bisher keine genauen Kenntnisse über die Mechanismen vor, die hinter der bemerkenswerten Wirksamkeit stehen. Eine bisherige Erklärung für Mundspüllösungen ist die Retention von Zinnionen auf der Zahnoberfläche.

Bei der EDX-Analyse der Oberflächen der in vitro Proben zeigte GelKam mit 2,7 wt% den höchsten Zinngehalt. Die chitosanhaltige Zahnpaste siedelte sich mit einem Zinngehalt von 2,1 wt% in der Mitte an, die Zahnpaste F/Sn zeigte mit 0,9 wt% den geringsten Zinngehalt. Vergleichbare Untersuchungen zur Zinnretention nach Anwendung zinnhaltiger Zahnpasten existieren nach Wissen der Autorin nicht.

Allerdings wurden in der Vergangenheit bereits Studien zur Zinnretention auf der Schmelzoberfläche nach der Anwendung zinnhaltiger Mundspüllösungen durchgeführt, die hier zum Vergleich herangezogen werden sollen. Es muss dabei jedoch bedacht werden, dass Mundspüllösungen in ihrer Zusammensetzung weniger komplex sind als Zahnpasten. So enthalten Zahnpasten neben den Wirkstoffen auch noch Zusatzstoffe wie Konservierungsmittel, Bindemittel, Feuchthaltemittel, Tenside und Putzkörper.

Auch die Anwendung der Produkte unterscheidet sich, da die Lösungen durch Spülen und die Zahnpasten durch Bürsten mit der Zahnhartsubstanz in Verbindung gebracht werden.

In einer in vitro Studie wurden Lösungen mit unterschiedlichem Zinngehalt im Hinblick auf ihr antierosives Potential getestet. Zusätzlich wurden die Zinnretention sowie die Zinninkorporation, vergleichbar mit der in den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden, gemessen. Die Proben wurden 10 Tage lang zyklisch demineralisiert und remineralisiert. Dabei zeigte die Lösung mit dem höchsten Zinngehalt von 2100 ppm  $\text{Sn}^{2+}$  eine Ablagerung von mittelwertig 18,3 wt% Zinn auf der Oberfläche. Die Lösung mit einem Zinngehalt von 1400 ppm zeigte mittelwertig 14,5 wt% und die Lösung mit einem Zinngehalt von 400 ppm mittelwertig 6,1 wt% Zinn auf der Oberfläche [Schlueter et al., 2009b].

Eine weitere in vitro Studie zeigte nach rasterelektronenmikroskopischer Analyse von Schmelzproben die Ablagerung von Zinn auf der Oberfläche. Die Schmelzproben wurden für 30 Sekunden, 4 Minuten, 8 Minuten, 24 Stunden, 48 Stunden beziehungsweise eine Woche in eine 10%ige zinnfluoridhaltige Lösung gegeben. Die anschließende Analyse ergab einen Zinngehalt von 0,6 wt%, 1,7 wt%, 0,2 wt%, 12,8 wt%, 17,0 wt% und 32,0 wt% [Wei und Forbes, 1974].

In beiden genannten Studien konnte also gezeigt werden, dass es nach Behandlung von Schmelzproben mit zinnhaltigen Lösungen zu einer Ablagerung von Zinn auf der Oberfläche kommt. Diese Studien zeigen zum Teil höhere Zinnwerte als in der vorliegenden Arbeit. Dies liegt unter anderem daran, dass es sich bei zuvor genannten Studien um flüssige Testprodukte handelt, mit denen die Proben behandelt wurden. Dabei war die Einwirkzeit zum Teil länger und die Zinnkonzentration höher als bei den Produkten der vorliegenden Studie. Es scheint also eine Dosis-Wirkungsbeziehung vorzuliegen.

Es zeigt sich jedoch, dass nicht nur Einwirkzeit und Konzentration, sondern auch die Verfügbarkeit des Zinns in dem Testprodukt eine Rolle spielen.

Durch die verschiedenen Zusatzstoffe in den Zahnpasten kann die Verfügbarkeit von Zinn eingeschränkt sein [Schlueter et al., 2013a]. Um daher eine bessere Vergleichbarkeit mit bisher erfolgten Studien unter Verwendung von Mundspüllösungen zu ermöglichen und eine Positivkontrolle mit möglichst wenig Zusatzstoffen bereitzustellen, wurde in der vorliegenden Studie GelKam verwendet.

In der in vitro Studie war nach Verwendung des Gels eine höhere Zinnablagerung auf den Schmelzproben messbar als nach Verwendung der Zahnpasten. Dafür gibt es verschiedene Erklärungsansätze.



Die Zusammensetzung des Gels könnte dabei eine große Rolle spielen. Dieses enthält weniger Zusatzstoffe als Zahnpasten, so unter anderem, wie bereits erwähnt, keine Abrasivstoffe. Es kann zu Wechselwirkungen zwischen dem Zinnion und den Abrasiva kommen. Zumeist werden Silica verwendet, so auch in den Zahnpasten, die auf den Proben der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Silica haben ein negatives elektrokinetisches Potential, so dass Zinnionen durch elektrostatische Anziehung potentiell daran binden können. In einer Studie wurde der Zinngehalt einer zinnhaltigen Zahnpaste sowohl durch chemische Extraktion bestimmt als auch in dem Überstand der Zahnpasta gemessen. Es wurde deutlich, dass der Zinngehalt in dem Überstand geringer war, als nach chemischer Extraktion. Dabei war der Zinngehalt auf der Oberfläche von Silica um diese Differenz höher [Ganss et al., 2012]. Dies weist darauf hin, dass ein Teil der Zinnionen eine Verbindung mit Silica eingegangen sind. Diese scheint zudem ziemlich stabil zu sein, sodass die Zinnionen offensichtlich nicht mehr verfügbar sind.

Zudem enthält GelKam im Gegensatz zu den anderen verwendeten Produkten kein Wasser. Eine Theorie ist, dass das Zinnion in wässrigen Lösungen mit dem Sauerstoff aus dem Wasser reagieren und stabiles Zinnoxid oder Zinnhydroxid bilden kann [Honnick und Zuckerman, 1976]. Durch diese Reaktion würden Zinnionen ebenfalls für die Bindung an die Oberfläche verloren gehen.

In wasserfreien Produkten ist die Stabilität höher, da es nicht zu einer Reaktion zwischen Zinn und Sauerstoff kommen kann. In einer Studie zu Hypersensibilität konnte gezeigt werden, dass Zinn in einem wasserfreien Produkt leichter verfügbar ist und sich nach Aufbürsten des Produktes auf der Dentinoberfläche ablagert. Im Vergleich dazu zeigte sich nach Verwendung eines wasserhaltigen Produktes keine zinnhaltige Schicht auf der Zahnhartsubstanzoberfläche. Zudem enthält das wasserfreie Produkt GelKam Glycerin. Glycerin ist ein kurzkettiger Zuckeralkohol welcher die Oxidation und Hydrolyse von Zinnfluorid zumindest theoretisch verhindern oder reduzieren kann [Shannon, 1969]. Es wird außerdem in der Industrie als Feuchthaltemittel und Schmiermittel eingesetzt und kann nachweislich die Abrasivität von Silica beeinflussen [Harte und Manly, 1976]. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass Glycerin eine Art Schmierschicht um die Abrasivstoffe bildet und somit die physikalischen Einflüsse des Bürstens mit einer Paste, also auch das Abbürsten der Zinnschicht auf der Oberfläche verringert. Zwar ist Glycerin auch den anderen Zahnpasten beigemischt, jedoch nur in geringen Mengen, während es für GelKam die Grundlage bildet.

Ein weiterer Aspekt ist, dass Zinnfluorid in wässrigen Lösungen stabilisiert werden muss. Die Pasten enthalten Zinn in Form von Zinnchlorid und zusätzlich Aminfluorid,

welches das eigentlich instabile Zinn stabilisieren kann [Barbakow et al., 1985]. Dadurch kann die Bioverfügbarkeit an freiem Zinn herabgesetzt sein [Miller et al., 1994]. Ob diese Reaktionen im vorliegenden Fall tatsächlich stattgefunden haben, darüber kann bisher jedoch nur spekuliert werden.

Allerdings konnten durch die vorliegende Studie diese Überlegungen insofern bestätigt werden, als dass sich nach Verwendung der wasserhaltigen Produkte eine geringere Menge an Zinn auf der Oberfläche zeigte.

Interessanterweise zeigte die F/Sn/Chitosan Zahnpaste, welche zusätzlich zu den Zinn- und Fluoridverbindungen Chitosan enthält, unter in vitro Bedingungen eine größere Menge an Zinn auf der Zahnoberfläche als das Produkt mit den gleichen Inhaltsstoffen ohne Chitosan (F/Sn). Da beide Zahnpasten sonst inhaltlich identisch waren und auch die gleichen Mengen an Abrasiva enthielten, lässt sich dieser Umstand offensichtlich auf die Anwesenheit von Chitosan zurückführen.

Chitosan ist ein positiv geladenes Biopolymer und kann an negativ geladene Oberflächen adsorbieren. Es konnte gezeigt werden, dass sich bei Kontakt von Chitosan mit negativ geladenen Teilchen aufgrund von elektrostatischen Anziehungskräften eine erste Chitosanschicht auf der negativen Oberfläche bildet. Daraus folgt eine Verschiebung der Oberflächenladung zum Positiven. Es folgt trotzdem weitere Adsorption; dabei kommt es zur Ausbildung einer mehrlagigen Chitosanschicht, wobei die Chitosanmoleküle untereinander durch hydrophobe Interaktion, Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waal's Kräfte in Verbindung stehen und angezogen werden [Guo und Gemeinhart, 2008].

Auch menschlicher Schmelz hat eine negativ geladene Oberfläche [Young et al., 1997]. Somit ist es wahrscheinlich, dass Chitosan auch an die Schmelzoberfläche binden kann und dort eine mehrlagige Chitosanschicht bildet.

Es wird vermutet, dass Chitosan als Adsorber fungiert und in wässrigen oder organischen Lösungen Metallionen binden kann [Muzzarelli und Tubertini, 1969]. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass es durch die Modifikation von Glaskugeln mit Chitosan zu einer Anheftung von Zinnionen kam [Liu et al., 2002]. Es wäre daher durchaus plausibel, dass nach der Adsorption von Chitosan an die Schmelzoberfläche eine Bindung der Zinnionen an die Chitosanschicht erfolgt. Dies könnte im vorliegenden Fall die größere Menge an Zinn auf der Oberfläche nach Verwendung der chitosanhaltigen Zahnpaste erklären.

Auch unter in situ Bedingungen zeigte sich nach Verwendung von GelKam, verglichen mit den zinnhaltigen Zahnpasten, sowohl bei den gebürsteten als auch bei den ungebürsteten Proben der höchste Zinngehalt auf der Oberfläche. Ebenso zeigte F/Sn/Chitosan in beiden Fällen einen höheren Zinngehalt als F/Sn.

Es ist wahrscheinlich, dass dabei die gleichen Aspekte, wie bereits zuvor für die in vitro Studie genannt, eine Rolle spielen. Zusätzlich müssen jedoch die Besonderheiten unter in situ Bedingungen betrachtet werden. Wie bereits im Kontext der Rauheitsmessungen erwähnt, ist unter Mundbedingungen der Speichel anwesend, durch dessen Einwirkung es zur Bildung der Pellikel kommt.

Die Pellikel ist eine organische azelluläre Schicht aus adsorbierten Proteinen, Glycoproteinen und anderen Makromolekülen aus der die Zähne umgebenden Speichelflüssigkeit, welche sich an dem Hydroxylapatit des Schmelzes anheftet [Yin et al., 2006]. Schon einige Sekunden nach Kontakt der Schmelzoberfläche mit Speichel beginnt die Ausbildung der Pellikel [Hannig und Balz, 1999]. Dabei binden verschiedene Proteine wie zum Beispiel Statherin und Histatin an die Oberfläche und bilden eine 10-20 nm dicke Schicht [Hannig und Joiner, 2006]. In der zweiten Phase der Pellikelformation bildet sich eine 100-1000 nm dicke Schicht durch weitere Adsorption von Proteingruppen [Hannig et al., 2001; Vukosavljevic et al., 2014]. Grundsätzlich zeigt die organische Schicht der Pellikel eine schützende Wirkung in Bezug auf erosiv bedingten Zahnhartsubstanzverlust, indem sie eine physikalische Barriere zwischen Säure und Schmelzoberfläche bildet [Siqueira et al., 2012]. Dabei spielen sowohl die Dicke, als auch der Reifegrad der Pellikel eine Rolle [Vukosavljevic et al., 2014]. Es wurde gezeigt, dass eine dickere Schicht einen besseren Schutz gegen Erosionen erzielte [Amaechi et al., 1999]. Hannig et al. zeigten in einer Studie, dass ein unterschiedlicher Reifegrad der Pellikel in keinem signifikanten Unterschied in Bezug auf Substanzverlust resultiert. Dabei wurden verschiedene Reifezeiten zwischen 2 und 24 Stunden gewählt [Hannig et al., 2003]. In einer in situ Studie konnte nachgewiesen werden, dass durch die Anwesenheit der Pellikel der abrasive Substanzverlust nach Bürsten der Proben mit einer herkömmlichen fluoridhaltigen Zahnpaste signifikant reduziert werden konnte (Substanzverlust ohne Pellikel 0,23 µm, Substanzverlust mit Pellikel 0,03 µm;  $p \leq 0,05$ ) [Joiner et al., 2008].

Zwar ist bisher nicht geklärt, in wieweit die positiven Effekte von zinnhaltigen Zahnpasten, die unter in vitro Bedingungen gezeigt wurden, durch die Anwesenheit der Pellikel beeinflusst werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Zinnfluorid in der Lage ist an Speichelproteine zu adsorbieren, und dort die vernetzenden Aktivitäten zu beeinflussen [Veeregowda et al., 2011], wodurch die Porosität der Proteinschicht und damit die Ionendurchlässigkeit sinkt [Berg et al., 2003]. Durch die Adsorption von

Zinnionen an die Speichelproteine in der Pellikel kann daraus eine höhere Resistenz gegenüber erosiven Säuren resultieren. In diesem Zusammenhang zeigte eine in vitro Studie die Effekte von Zinn und Fluorid in Kombination mit der Pellikel. Bovine Schmelzproben wurden nach Pellikelformation fünf Tage lang sechsmal täglich 5 Minuten demineralisiert (pH 2,6) und dreimal täglich für zwei Minuten mit unterschiedlichen Testlösungen behandelt ( $\text{SnCl}_2$ ,  $\text{Sn}+\text{F}$  ( $\text{SnCl}_2 + \text{NaF}$ ),  $\text{NaF}$ ). Anschließend wurde der Substanzverlust gemessen, wobei es bei allen Lösungen zu einer Reduktion des Substanzverlustes kam, verglichen mit einer Negativkontrolle (destilliertes Wasser).  $\text{Sn} + \text{F}$  zeigte eine Reduktion um 89%,  $\text{SnCl}_2$  um 67% und  $\text{NaF}$  um 42%. Anschließend wurde die Proteinzusammensetzung der Pellikel analysiert. Es wird diskutiert, dass bestimmte Proteine die antierosive Wirksamkeit von Zinn und Fluorid beeinflussen können [Algarni et al., 2015]. Rykke et al konnten bereits zeigen, dass sich die Aminosäurezusammensetzung von in situ Pellikel nach Behandlung mit  $\text{SnF}_2$  ändert [Rykke et al., 1991]. In der zuvor erwähnten Studie zeigte sich in der  $\text{SnF}$  Gruppe ein signifikant höherer Anteil an Muzinen (MUC7 und MUC5B). Diese Muzine bilden höchstwahrscheinlich eine physikalische Barriere zwischen Säure und Zahnoberfläche. MUC5B zeigte dabei eine hohe Säurestabilität [Hannig et al., 2009]. Auch der Gehalt an Albumin war in der  $\text{SnF}$  Gruppe höher als in den anderen Gruppen. Es wurde gezeigt, dass Albumin in Anwesenheit von Zinn und Fluorid den Schutz vor Erosion und Abrasion erhöht [Hara et al., 2013; Algarni et al., 2015].

Auch im Hinblick auf Chitosan ist die Rolle der Pellikel interessant. Chitosan hat die Tendenz, an die Pellikel zu adsorbieren. Durch die positiv geladenen Aminogruppen in Chitosan kommt es zu einer Interaktion mit der negativ geladenen Oberfläche der Pellikel. Dabei kommt es zu einer Umkehrung der Ladung der Pellikel. Zudem induziert Chitosan durch elektrostatische Interaktionen eine Aggregation von Speichelproteinen zu der mit Chitosan bedeckten Pellikel [van der Mei et al., 2007]. Dadurch kommt es zu einer Verdickung der Pellikel, woraus eine höhere Resistenz gegen Säuren resultieren kann. Außerdem wurde gezeigt, dass die an Muzine gebundene Chitosanschicht stabil ist gegen oberflächenaktive Substanzen wie zum Beispiel Tenside [Dedinaite et al., 2005]. Auch Svensson et al. konnten eine gegen Abspülen stabile Bindung zwischen Chitosan und Muzinen zeigen, welche auf eine starke Interaktion der Partikel untereinander hinweist [Svensson et al., 2008]. Tenside sind wegen der Schaumwirkung zu einem geringen Teil Zahnpasten zugesetzt. Somit wäre es möglich, dass Wirkstoffe der Zahnpaste, im vorliegenden Fall Fluorid und Zinn mit Hilfe von Chitosan stabil an die von Pellikel bedeckte Zahnoberfläche binden und nicht so leicht durch Tenside von der Oberfläche gelöst werden können. Daraus würde eine größere

Menge an Zinn auf der Oberfläche resultieren. Aber auch eine Interaktion von Speichelproteinen mit der chitosanbedeckten Schmelzoberfläche ist möglich.

Durch die Zugabe von Chitosan zur F/Sn-haltigen Paste wurde die Zinnretention im Vergleich zur F/Sn-Paste nicht verringert, jedoch auch nicht erhöht. Es konnte gezeigt werden, dass Chitosan an negativ geladene Mica-Oberflächen (aus Schichtsilikaten gebildete Oberfläche) adsorbiert und dort bei einem pH-Wert von 6 eine kompakte Schicht ausbildet. Dabei kommt es durch eine Verringerung der elektrostatischen Anziehungskräfte zum Austausch von einzelnen Glucosaminsegmenten des Chitosans mit Ionen aus der Umgebung. Sinkt der pH-Wert, steigt die Anziehungskraft der Segmente untereinander und es kommt zur Ausbildung einer flach der Oberfläche anliegenden Schicht der Chitosanmoleküle. Diese Schicht bleibt auch bei saurem pH-Wert (pH = 3,6) auf der Oberfläche bestehen [Claesson und Ninham, 1992]. Diese Ergebnisse konnten in einer weiteren Studie bestätigt werden, in der es auf schmelzähnlichen Oberflächen (mit Hydroxylapatit bedeckte Kristalle) nach Erzeugung einer künstlichen Pellikel zur Ausbildung einer Chitosanschicht kam. Daraufhin wurden die Proben in 10 Zyklen mit jeweils 5 minütiger Erosion in Zitronensäure (pH = 2,8) demineralisiert. Es wurde gezeigt, dass die ausgebildete Schicht, vor allem wenn die Chitosanmoleküle untereinander vernetzt sind, die Oberfläche vor Erosion schützen kann [Lee et al., 2012]. Es ist somit denkbar, dass die Eigenschaften von Chitosan zu einer besseren Retention der Zinnionen unter sauren Bedingungen führen können, indem es zur Ausbildung einer Chitosanschicht auf der Oberfläche kommt, welche sich wiederum mit Zinn anreichert.

Ob es zur Ausbildung einer solchen Schicht auch unter Mundbedingungen kommen kann, und wie lange die antierosive Wirkung anhält, muss noch weiter untersucht werden.

In den für diese Arbeit durchgeführten Studien zeigte zwar nach Behandlung mit der chitosanhaltige Paste auf den Probenoberflächen einen höheren Zinngehalt als bei der Paste ohne Chitosan, es konnte aber keine größere Menge an Zinn unter in situ Bedingungen im Vergleich zu in vitro Bedingungen gezeigt werden. Daraus wird deutlich, dass der Wirkungsmechanismus in situ noch wesentlich komplexer ist als unter in vitro Bedingungen und bisher noch nicht ausreichend geklärt werden konnte. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Chitosan die Effektivität der zinnhaltigen Pasten erhöht, indem es vermutlich eine Verdickung der Pellikel und die Umkehr der Ladung von negativ zu positiv induziert. Daraus folgt, dass der Einfluss erosiver Säuren vermutlich verringert wird und es somit wohl zu einer Reduktion des Substanzverlustes kommt.

Bei der Elementanalyse der Oberflächen wurde ein deutlicher Unterschied in der Verteilung der Elemente zwischen in vitro und in situ Proben deutlich. Während der Kohlenstoffgehalt der gebürsteten in vitro Proben bei durchschnittlich 5,7 Gewichtsprozent lag, betrug der Kohlenstoffgehalt der entsprechenden in situ Proben 21,6 Gewichtsprozent und bei den ungebürsteten Proben sogar 28,6 Gewichtsprozent. Dieser große Unterschied ist im Wesentlichen auf die Anwesenheit der Pellikel auf den in situ Proben zurückzuführen. Der hohe Kohlenstoffanteil entsteht durch die vielen organischen Bestandteile der Pellikel. Um vergleichbare Ergebnisse zu erreichen wurde eine kohlenstoffbereinigte Auswertung der Daten der in situ Proben vorgenommen. Da im vorliegenden Fall bei der quantitativen Elementanalyse die relativen Anteile der einzelnen Elemente bestimmt wurden, stieg durch die Entfernung des Kohlenstoffs der Zinngehalt. Es wird jedoch deutlich, dass sich lediglich die Werte erhöhten, das Verhältnis der gemessenen Werte der verschiedenen Pasten zueinander änderte sich jedoch nicht.

Es ist jedoch unklar, inwieweit die Messergebnisse durch die Anwesenheit der Pellikel beeinflusst wurden. Es ist unwahrscheinlich, dass die Elementanalyse tatsächlich den Zinngehalt auf der Oberfläche der Zahnhartsubstanz wiedergibt, vielmehr erfolgte die Messung wahrscheinlich zum Teil in den Bestandteilen der Pellikel. Da die Pellikel die Probenoberfläche bedeckt hat, ist es wahrscheinlich, dass der Elektronenstrahl nicht bis auf die Schmelzoberfläche gelangen konnte. Um darüber Klarheit zu erlangen sind weitere Untersuchungen nötig, unter anderem auch die Elementanalyse nach Entfernung der Pellikel.

Das für die vorliegende Studie an einigen in situ Proben zusätzlich durchgeführte Experiment zur Säurestabilität des Zinns konnte zeigen, dass auch nach einer erneuten Demineralisation die Zinnablagerungen auf der Oberfläche stabil blieben.

Diese Säurestabilität konnte bereits in einer in vitro Studie gezeigt werden. Dabei wurden verschiedene hochkonzentrierte fluoridhaltige Lösungen auf ihre antierosive Wirksamkeit untersucht. Nach einer 3 minütigen Vorbehandlung mit den verschiedenen Lösungen wurden die Proben für 5 Tage 6 x täglich für eine Minute in Zitronensäure ( $\text{pH} = 2,6$ ) demineralisiert und anschließend remineralisiert. Die EDX-Analyse der Oberflächen am Ende der Testphase zeigte bei einer  $\text{Sn/F}$  -Lösung (7,5 g Zinnfluorid/100 ml  $\triangleq$  5700 ppm  $\text{Sn}^{2+}$  und 1800 ppm  $\text{F}^-$ ,  $\text{pH} = 2,7$ ) vor Erosion einen Zinngehalt von 2,09 wt% und nach Erosion 1,06 wt%. Die selbe Lösung zeigte bei einem pH-Wert von 4 vor Erosion 1,26 wt% Zinn und nach Erosion 1,08 wt% Zinn auf der Oberfläche [Yu et al., 2010].

Aus den Ergebnissen des Versuches lässt sich schließen, dass es nach Verwendung von zinnhaltigen Zahnpasten zur Ausbildung einer zinnhaltigen Schicht auf der Oberfläche der Zahnhartsubstanz kommt, die auch bei weiterer Säureexposition nicht vollständig verloren geht. Dies konnte bereits in einer anderen Studie für Mundspüllösungen gezeigt werden [Schlueter et al., 2009b]. Es wurde bei der Reaktion von Zinnchlorid mit Hydroxylapatit die Ausbildung einer Schicht auf der Oberfläche beobachtet, welche nach Erosion den Substanzverlust reduzieren konnte [Stenhagen et al., 2013]. Dabei kommt es zur Ausbildung säureresistenter metallreicher Präzipitate [Ellingsen, 1986]. Es wird diskutiert, dass die Schicht  $\text{Sn}_2\text{OHPO}_4$ ,  $\text{Sn}_3\text{F}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{Ca}(\text{SnF}_3)_2$  und  $\text{CaF}_2$  enthält [Babcock et al., 1978; Schlueter et al., 2009b].

### 4.3.3 Zinninkorporation

Die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit zeigen, dass unter in vitro Bedingungen eine Inkorporation von Zinn in die oberen Schmelzschichten stattfindet.

Dass der Einbau von Zinnionen aus zinnhaltigen Mundspüllösungen auch in tiefere Schichten des Schmelzes erfolgt, konnte in einer Studie bereits gezeigt werden. Zinn wurde jedoch nur aufgenommen, wenn zeitgleich eine zyklische Demineralisation erfolgte. In gesundem Schmelz konnte kein Zinn in tieferen Schichten nachgewiesen werden, auch wenn sich vergleichbare Mengen an Zinn auf der Oberfläche befanden. Es werden komplexe Vorgänge diskutiert, wobei wohl eine Demineralisation des Schmelzes und anschließende Repräzipitation von Zinnionen stattfindet, die zu einem Einbau von Zinn in die Zahnhartsubstanz führen [Schlueter et al., 2009b]. In der zitierten Studie erfolgte die Einlagerung der Zinnionen in wesentlich tiefere Schichten (bis zu 30  $\mu\text{m}$  unterhalb der Oberfläche) als nach der Verwendung der Zahnpasten in der vorliegenden Studie. In der vorliegenden Studie wurden die Messungen direkt unter der Oberfläche durchgeführt. In den Querschnitten der Proben konnte dabei für F/Sn/Chitosan ein Zinngehalt (MEDIAN) von 1,26 wt%, für GelKam ein Wert von 1,22 wt% und für F/Sn von 0,03 wt% nachgewiesen werden.

Obwohl GelKam auf der Oberfläche den höchsten Zinngehalt zeigte, wurde nach Verwendung von F/Sn/Chitosan mehr Zinn in den Querschnitten gefunden. Diese Werte unterschieden sich außerdem signifikant von dem Wert der Paste ohne Chitosan. Die zuvor erwähnten Vorteile des Gels scheinen im vorliegenden Fall also nicht zu einer verbesserten Inkorporation von Zinn in tiefere Schichten geführt zu haben. Die Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass Chitosan die Inkorporation von Zinnionen in die Zahnhartsubstanz beeinflusst. In welchem Maß dies stattfindet und

wie die genauen Mechanismen aussehen, muss noch genauer untersucht werden, da Reaktionen mit Chitosan, wie bereits beschrieben, sehr komplex sind.

Bei den Proben der in situ Studien konnte kein Zinn in tieferen Schichten der Querschnitte festgestellt werden, obwohl sich auf der Oberfläche Zinn nachweisen ließ. Da die Proben auf ähnliche Weise behandelt wurden, wie die Proben der in vitro Studie (gleiche Zahnpasten, ähnliches Demineralisationsprotokoll, ähnliche Bürstabrasion), ist es wahrscheinlich, dass die Anwesenheit der Pellikel unter in situ Bedingungen, wie schon für die Oberflächen beschrieben, einen maßgeblichen Einfluss hat.

Ob dabei die Aufnahme von Zinn in tiefere Schichten der Zahnhartsubstanz durch die organischen Bestandteile verringert wird, ist bisher nicht geklärt.

Auch hier hatte Chitosan, wie für die Oberflächenanalyse unter in situ Bedingungen, keinen Einfluss auf die Ergebnisse.

### **4.3.4 Strukturanalyse**

#### **Oberflächen**

Die qualitative Strukturanalyse konnte keinen Zusammenhang zwischen der Struktur der Oberfläche und der Rauigkeit, beziehungsweise der Menge an Zinn auf der Oberfläche zeigen. Bei dem größten Teil der Proben war auf der Oberfläche ein Ätzmuster zu sehen, sowohl bei den in vitro als auch bei den in situ Proben. Es bestand dort auch kein Unterschied zwischen gebürsteten und ungebürsteten Proben. Auch die Präzipitate waren auf allen Proben relativ gleichmäßig zu sehen.

Es war jedoch ein Unterschied bezüglich der flächendeckenden krustenartigen Strukturen zu sehen. Bei den in situ Studien zeigten insgesamt 26% aller Proben krustenartige Präzipitate, unter denen kein Ätzmuster mehr erkennbar war. Dies beschränkte sich jedoch auf die zinnhaltigen Gruppen (43%), während sich auf den Proben, die mit NaF oder Placebopaste behandelt wurden, keine Krusten zeigten. Die in situ Proben, die noch zusätzlich erodiert wurden, zeigten ebenfalls bei 43% der zinnhaltigen Gruppen diese Strukturen, während bei den in vitro Proben solche Präzipitate nicht auftauchten. Eine Erklärung dafür ist wahrscheinlich erneut die organische Schicht auf der Oberfläche der in situ Proben, welche sowohl das Ätzmuster als auch Schleifspuren überdeckt. Dafür würde der hohe Kohlenstoffgehalt auf den Oberflächen der in situ Proben sprechen. Dagegen spricht jedoch, dass diese



Krusten nur bei den zinnhaltigen Gruppen auftauchten. Dies könnte darauf hinweisen, dass Zinn unter Mundbedingungen und unter Anwesenheit der Pellikel durch Reaktion zwischen den organischen und anorganischen Bestandteilen zu einer Formation von flächenhaften Krusten führen kann. Wie bereits zuvor erwähnt wird vermutet, dass es durch die Anwendung von Zinnchlorid zur Ausbildung einer Schicht kommt, welche unter anderem  $\text{Sn}_2\text{OHPO}_4$ ,  $\text{Sn}_3\text{F}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{Ca}(\text{SnF}_3)_2$  und  $\text{CaF}_2$  enthält. Es wird vermutet, dass sich diese Schicht mit der Pellikel verbindet und so auf der Zahnoberfläche verbleibt [Khambe et al., 2014].

In zwei in vitro Studien wurden bereits ähnliche Ergebnisse gezeigt. Dort wurde nach 7minütiger Behandlung von Schmelzproben mit einer 0,2 %igen  $\text{SnF}_2$  Lösung eine Deckschicht aus kleineren und größeren Präzipitaten sichtbar. Diese Schicht war zum Teil von Rissen durchzogen. Auch bei Proben, die zuvor erodiert worden waren, war eine Deckschicht zu erkennen, diese war jedoch nicht so homogen wie die Schicht der nicht erodierten Proben [Ellingsen, 1986]. Auch in einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass sich nach Behandlung mit zinnfluoridhaltigen Lösungen auf der Oberfläche erodierter Schmelzproben eine Deckschicht ausbildet, die darunter liegende Strukturen verdeckt [Cooley, 1961].

Ob diese Krusten zur guten Wirksamkeit der zinnhaltigen Produkte beitragen, beziehungsweise die Ursache dafür sind, kann nur vermutet werden. Im Hinblick darauf, dass diese Strukturen bei den in vitro Proben nicht zu sehen waren, sich dort jedoch allgemein eine gute Wirksamkeit der zinnhaltigen Produkte zeigte, ist es sehr unwahrscheinlich. Eine genauere Untersuchung der Strukturen nicht nur hinsichtlich ihrer Elementzusammensetzung, sondern auch hinsichtlich der sich gebildeten Verbindungen könnte darüber Aufschluss geben.

Die vorliegende Arbeit konnte nicht klären, ob es sich bei den Präzipitaten im Allgemeinen, welche sowohl in vitro als auch in situ auftraten, um zinnhaltige Partikel oder Ausfällungen aus anderen Bestandteilen der Zahnpasten oder der Remineralisationslösung beziehungsweise Speichelbestandteile handelt. Da die Präzipitate jedoch sowohl bei den zinnfreien als auch bei den zinnhaltigen Zahnpasten auftraten und sich im Aussehen nicht deutlich voneinander unterschieden, handelt es sich wahrscheinlich nicht ausschließlich um zinnhaltige Präzipitate.

### Querschnitte

Die in den Querschnitten sichtbare bandförmige strukturelle Veränderung unterhalb der Oberfläche konnte bereits zuvor nachgewiesen werden. So zeigte sich in einer in vitro Studie an erodierten Schmelzproben eben diese Veränderung. Es wurden Proben der

Negativkontrolle (nur Demineralisation) und Proben, die nach Demineralisation mit zinnfluoridhaltigen Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen behandelt wurden, untersucht. Die Querschnitte zeigten bei allen Proben eine strukturell veränderte Zone unterhalb der Oberfläche. Die Negativkontrolle wies ein mittelwertig  $8,9 \pm 1,6 \mu\text{m}$  breites verändertes Band auf. Bei den Testlösungen zeigte sich bei gleichzeitig reduziertem Substanzverlust ein breiteres, strukturell modifiziertes Band (Zinngehalt 400 ppm: mittelwertig  $18,4 \pm 4,4 \mu\text{m}$ ; Zinngehalt 1,400: mittelwertig  $24,0 \pm 4,9 \mu\text{m}$ ; Zinngehalt 2,100 ppm: mittelwertig  $26,9 \pm 5,8 \mu\text{m}$ ) [Schlueter et al., 2009b]. Im vorliegenden Fall zeigte sich sowohl bei den Zahnpasten mit, als auch ohne Zinn und bei der Negativkontrolle eine veränderte Zone. Wie in der zuvor genannten Studie war bei der Negativkontrolle, aber auch bei der Zahnpaste ohne Zinn das Band schmaler. Es ist wahrscheinlich, dass die Demineralisation zu einer strukturell veränderten Zone führte, welche durch den Einfluss von Zinn noch weiter modifiziert wurde. Es ist jedoch nicht abschließend geklärt, ob allein die Zinnionen die Bildung der strukturell modifizierten Schicht bewirken, oder ob diese auch durch Fluoridionen beeinflusst wird. Es ist denkbar, dass es auch durch Remineralisations- bzw. Repräzipitationsvorgänge zu Veränderungen unter der Oberfläche kommt. Im vorliegenden Fall waren die Veränderungen sowohl unter in vitro als auch unter situ Bedingungen zu erkennen. Unter in vitro Bedingungen könnte es zur Einlagerung unterschiedlichster Elemente aus der Remineralisationslösung gekommen sein. Dort zeigte die veränderte Zone eine Lamellenstruktur, welche bei den in situ Proben weniger zu beobachten war. Diese ist auf die Remineralisationslösung der in vitro Versuche zurückzuführen, während es durch das im Speichel enthaltene Statherin unter in situ Bedingungen nicht beziehungsweise kaum zur Ausbildung solcher Strukturen kam.

#### 4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Schlussfolgernd ist zu sagen, dass die Wirksamkeit zinnfluoridhaltiger Zahnpasten mit der Bildung einer zinnhaltigen Schicht auf der Oberfläche zusammenhängt. Diese Schicht kann sowohl Erosion durch Säuren als auch zusätzliche Abrasion durch Bürsten verringern. Es ist wahrscheinlich, dass die Struktur der Zahnhartsubstanz durch Zinnablagerungen auf und unter in vitro Bedingungen Zinnaufnahme in die Oberfläche beeinflusst wird, und dass mögliche strukturelle Veränderungen einen höheren Schutz vor Säure bieten. Es wurde deutlich, dass unter in vitro Bedingungen eine Aufnahme von Zinn in tiefere Schichten des Schmelzes mit geringerem Substanzverlust korreliert. Die Zugabe von Chitosan zeigte unter in vitro Bedingungen vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich der Aufnahme von Zinn in die Zahnhartsubstanz und die Reduzierung eines Substanzverlusts. Der Reaktionsmechanismus unter in situ Bedingungen ist allerdings offensichtlich sehr viel komplexer als unter in vitro Bedingungen und scheint sich deutlich davon zu unterscheiden. Zur vollständigen Aufklärung sind weitere Untersuchungen notwendig. Es scheint dabei nicht alleine die Ablagerung und Inkorporation der Zinnionen ausschlaggebend zu sein. So zeigte die chitosanhaltige Paste keinen höheren Zinngehalt, jedoch eine höhere Effektivität. Es ist wahrscheinlich, dass die Pellikel und damit die Reaktionen an der Oberfläche zwischen Pellikel und Zinnionen beziehungsweise Chitosan eine große Rolle spielen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten einen Einblick in den Wirkungsmechanismus zinnhaltiger Zahnpasten unter in vitro Bedingungen geben. Dabei kommt es zur Bildung einer zinnhaltigen Schicht auf, und einem Einbau von Zinn in die Schmelzoberfläche. Daraus resultiert eine Reduzierung des erosiv- und erosiv/abrasiv- bedingten Zahnhartsubstanzverlustes.

Unter in situ Bedingungen konnte zwar eine zinnhaltige Schicht auf der Oberfläche nachgewiesen werden, nicht jedoch eine Inkorporation in tiefere Schichten.

Die Erforschung des genauen Wirkungsmechanismus zinnhaltiger Zahnpasten, insbesondere in Kombination mit dem Biopolymer Chitosan und unter in situ Bedingungen, sollte also Gegenstand der Forschung bleiben. Studien unter Mundbedingungen, die den Einfluss der Pellikel untersuchen, können dabei hilfreich sein. So wäre es interessant den Zinngehalt nach der Entfernung der organischen Schicht zu messen, beziehungsweise zu untersuchen, ob die Pellikel eine Art Barriere bildet, welche zwar die Ablagerung von Zinn in gewissem Maße zulässt, ein Eindringen der Zinnionen in tiefere Schichten des Schmelzes jedoch verhindert. Die Vorgänge an

der Oberfläche scheinen um einiges komplexer zu sein als unter in vitro Bedingungen und dabei ist insbesondere die Rolle von Chitosan sehr interessant.

Abschließend ist zu sagen, dass die vielversprechenden Ergebnisse hinsichtlich Substanzverlustreduktion der untersuchten Pasten die klinische Relevanz der vorliegenden Studie zeigen. Zur Aufklärung des genauen Wirkungsmechanismus sollten beispielsweise ultrastrukturelle Untersuchungen zur Reaktion zwischen Chitosan, Zinn und Speichelbestandteilen (z.B. Muzin, Statherin) erfolgen.

## 5 Zusammenfassung

Es wurden Proben aus einer bereits abgeschlossenen in vitro und zwei in situ Studien nachuntersucht. In der in vitro Studie wurden humane Schmelzproben für 10 Tage zyklischer Demineralisation (0,5%ige Zitronensäure, pH 2,5; 6 x 2 Minuten täglich) und während einer zweiminütigen Einwirkzeit in Zahnpastengemischen einem Bürsten (2 x 15 s/Tag, 200 g Gewicht) ausgesetzt. Für die randomisierten cross over in situ Studien trugen 10, beziehungsweise 27 Probanden für 7 Tage Apparaturen mit menschlichen Schmelzproben im Unterkiefer. Die Proben wurden außerhalb des Mundes demineralisiert (7 Tage, 0,5%ige Zitronensäure, pH 2,6; 6 x 2 Minuten/Tag) und intraoral 2 x 2 Minuten/Tag einem Zahnpastengemisch ausgesetzt. Dabei wurden 50% der Proben mit einer elektrischen Zahnbürste gebürstet (5 s, 2,5 N). In den Studien wurden folgende Pasten getestet: Placebopaste (Negativkontrolle), drei experimentelle Zahnpasten (NaF: 1400 ppm F<sup>-</sup>; F/Sn: 1400 ppm F<sup>-</sup>, 3500 ppm Sn<sup>2+</sup>; F/Sn/Chitosan: 1400 ppm F<sup>-</sup>, 3500 ppm Sn<sup>2+</sup>, 0,5% Chitosan) und ein zinnhaltiges Gel (Positivkontrolle, GelKam: 3000 ppm Sn<sup>2+</sup>, 1000 ppm F<sup>-</sup>)

Zusätzlich wurde in einem weiteren Experiment die Erosionsstabilität von Zinn auf in situ Proben gemessen, indem diese Proben erneut demineralisiert wurden (2 Minuten, 0,5%ige Zitronensäure).

Untersuchungsparameter waren die Oberflächenrauigkeit, die Retention und Inkorporation von Zinn, sowie morphologische Veränderung des Schmelzes auf der Oberfläche und im Querschnitt.

Die Oberflächenrauigkeit der Proben wurde mit einem optischen Profilometer bestimmt. Für die Bestimmung des Zinngehaltes auf den Oberflächen und in der Tiefe der Proben wurde die energiedisperse Röntgenspektroskopie genutzt. Eine qualitative Strukturanalyse erfolgte anhand von rasterelektronenmikroskopischen Bildern. Dabei wurden die Parameter Ätzmuster, Oberflächenbeschaffenheit beziehungsweise -struktur, sowie die Anwesenheit von Präzipitaten untersucht.

Die Rauigkeitsmessungen ergaben in der in vitro Studie nur geringe Unterschiede. Dabei zeigte GelKam die niedrigste Rauigkeit. Die Untersuchung der in situ Proben ergab keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Der Vergleich der in vitro mit den in situ Proben zeigte signifikante Unterschiede bei F/Sn, F/Sn/Chitosan und GelKam, wobei die Werte der in situ Studie für alle Proben höher war (Ra und Rz). Auch für NaF zeigte die in situ Studie höhere Werte (nur Rz).

Bei der Untersuchung der Zinnablagerung auf der Oberfläche zeigte GelKam sowohl in vitro, als auch in situ (gebürstet und ungebürstet) den höchsten Zinnwert. Unter in vitro

Bedingungen, nicht jedoch unter in situ Bedingungen, konnte durch die Zugabe von Chitosan eine erhöhte Zinnablagerung im Vergleich zu der Paste ohne Chitosan erzielt werden.

Die Einlagerung von Zinn in tiefer Schichten der Proben konnte nur unter in vitro Bedingungen nicht aber für in situ Bedingungen nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich für die in vitro Proben ein Zusammenhang zwischen dem Zinngehalt in den Querschnitten und dem auf der Oberfläche. Die Strukturanalyse der Oberfläche ergab nur kleine Unterschiede in der Verteilung der Merkmale. In allen Gruppen waren Ätzmuster und Präzipitate zu sehen.

Zusammenfassend konnte unter in vitro Bedingungen die Wirkungsweise zinnhaltiger Zahnpasten weitestgehend erklärt werden. So geht eine größere Menge an Zinn auf der Oberfläche mit einer besseren Wirksamkeit einher, wobei Chitosan dabei die Zinnaufnahme und -retention erhöhen kann. Auch die Inkorporation von Zinnionen in tiefere Schichten spielt dabei eine Rolle. Dies konnte unter in situ Bedingungen nicht gezeigt werden. Es ist wahrscheinlich, dass die Anwesenheit der Pellikel die Wirkungsweise beeinflusst, wobei der genaue Mechanismus nicht abschließend geklärt werden konnte. Zum besseren Verständnis sind weitere Untersuchungen vor allem hinsichtlich der Interaktion von Zinnfluorid in Kombination mit Chitosan und der Pellikel unter in situ Bedingungen nötig.

## 6 Summary

For the present study specimens of one already completed in vitro and two in situ studies were investigated. For the in vitro study enamel samples were subjected to cyclic erosion procedures (10 days; 0.5% citric acid, pH 2.5; 6 x 2 min/day), and brushing (2 x 15 s/day, load 200g) during immersion in slurries (2 min). For the randomised cross over in situ studies 10 respectively 27 volunteers took part for 7 days. Samples were mounted on buccal shields of mandibular mouth appliances and worn for 24 h, except during meals and oral hygiene. Samples were demineralized extraorally with 0.05 M citric acid (pH 2.6) for 6 x 5 min per day and intraorally exposed to toothpaste suspensions (2 x 2 min/day). Within the suspension immersion time, one half of the specimens were additionally brushed intraorally with a powered toothbrush (5 s, 2.5 N). Tested preparations were a placebo toothpaste (negative control), three experimental toothpastes (NaF: 1400 ppm F<sup>-</sup>, F/Sn = 1400 ppm F<sup>-</sup>, 3500 ppm Sn<sup>2+</sup>; F/Sn/Chitosan = 1400 ppm F<sup>-</sup>, 3500 ppm Sn<sup>2+</sup>; 0.5 % Chitosan) and a SnF<sub>2</sub>-containing gel (positive control, GelKam = 3000 ppm Sn<sup>2+</sup>, 1000 ppm F<sup>-</sup>).

The stability of tin retention was investigated on the tin treated specimens from the in situ study by analysing the tin content prior and after an acid etching with citric acid (0.5% citric acid, 2 min).

Parameters of investigation were surface roughness, retention and incorporation of tin and structural changes of enamel on the surface and in cross sections.

Surface roughness was quantified profilometrically. Energy-dispersive X-ray spectroscopy was used to measure the tin content on and beneath the surface. In addition scanning electron microscopy was conducted. Investigated parameters were etching pattern, surface condition/structure and possible precipitates.

Regarding roughness only minor differences were found for in vitro, but not for the in situ specimens. Under in vitro conditions specimens treated with GelKam showed the lowest roughness values. The comparison of in vitro and in situ specimens showed significant differences for F/Sn, F/Sn/Chitosan and GelKam with higher values for the in situ specimens (Ra and Rz). For specimens treated with NaF in situ values were also higher (only Rz).

Tin retention on surfaces was highest after the use of GelKam, both under in situ and in vitro conditions and both with and without brushing. Under in vitro but not under in situ conditions, Chitosan was able to increase tin retention in comparison to the product without Chitosan.

An incorporation of tin was only found on the cross sections of the in vitro but not of the in situ specimens. The amount of incorporated tin was related to tin retention on the surface. Structural analysis revealed only small differences between the various groups; in all groups etching pattern and precipitates were found.

Concluding the results only under in vitro conditions but not under in situ conditions effect related differences in mode of action between both tin containing toothpastes were found. Under in vitro conditions the better effect of the Chitosan containing toothpaste can be explained with a higher tin retention, however, this does not apply for in situ conditions. The presence of the pellicle seems to modify the mode of action distinctly. Further research is necessary for a better elucidation of the mode of action, especially regarding the interaction of tin-fluoride in combination with Chitosan and the pellicle.



## Literaturverzeichnis

1. Addy M, Hunter ML: Can tooth brushing damage your health? Effects on oral and dental tissues. *Int Dent J* 2003;53 Suppl 3:177-186.
2. Algarni AA, Mussi MC, Moffa EB, Lippert F, Zero DT, Siqueira WL, Hara AT: The impact of stannous, fluoride ions and its combination on enamel pellicle proteome and dental erosion prevention. *PLoS One* 2015;10:e0128196.
3. Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM, Milosevic A: Thickness of Acquired Salivary Pellicle as the Determinant of the Sites of Dental Erosion. *J Dent Res* 1999;32:1821-1828.
4. Arnaud TM, Neto BD, Diniz FB: Chitosan effect on dental enamel remineralization: An in vitro evaluation. *J Dent* 2010.
5. Attin T, Hilgers RD, Hellwig E: Einfluß von Muzin im Speichel auf die Entstehung von Schmelzerosionen. *Dtsch Zahnärztl Z* 1996;51:506-510.
6. Attin T, Koidl U, Buchalla W, Schaller HG, Kielbassa AM, Hellwig E: Correlation of microhardness and wear in differently eroded bovine dental enamel. *Arch Oral Biol* 1997;42:243-250.
7. Babcock FD, King JC, Jordan TH: The reaction of stannous fluoride and hydroxyapatite. *J Dent Res* 1978;57:933-938.
8. Barbakow F, Lutz F, Sener B: In vitro dissolution of human enamel after application of a mixture of stannous fluoride and amine fluoride 297: a pilot study. *ASDC J Dent Child* 1985;52:444-448.
9. Bartlett D: Intrinsic causes of erosion; in Lussi A (ed): *Dental Erosion. Monogr Oral Sci.* Basel, Karger, 2006 pp 119-139.
10. Bartlett D, Ganss C, Lussi A: Basic Erosive Wear Examination (BEWE): a new scoring system for scientific and clinical needs. *Clin Oral Invest* 2008;12:S65-S68.
11. Berg IC, Rutland MW, Arnebrant T: Lubricating properties of the initial salivary pellicle--an AFM study. *Biofouling* 2003;19:365-369.
12. Bolay S, Cakir FY, Gurgan S: Effects of Toothbrushing with Fluoride Abrasive and Whitening Dentifrices on Both Unbleached and Bleached Human Enamel Surface in Terms of Roughness and Hardness: An in vitro Study. *The journal of contemporary dental practice* 2012;13:584-589.
13. Caslavskaja V, Moreno EC, Brudevold F: Determination of the calcium fluoride formed from in vitro exposure of human enamel to fluoride solutions. *Arch Oral Biol* 1975;20:333-339.
14. Cheaib Z, Lussi A: Impact of acquired enamel pellicle modification on initial dental erosion. *Caries Research* 2011;45:107-112.

15. Claesson PM, Ninham BW: pH-Dependent Interactions between Adsorbed Chitosan Layers. *Langmuir* 1992;8:1406-1412.
16. Cooley WE: Reactions of tin(II) and fluoride ions with etched enamel. *J Dent Res* 1961;40:1199-1210.
17. Davis WB, Winter PJ: The effect of abrasion on enamel and dentine and exposure to dietary acid. *Br Dent J* 1980;148:253-256.
18. Dawson PL, Walsh JE, Morrison T: Dental stain prevention by abrasive toothpastes: A new in vitro test and its correlation with clinical observations. *J Cosmet sci* 1998;49:275-283.
19. Dedinaite A, Lundin M, Macakova L, Auletta T: Mucin-chitosan complexes at the solid-liquid interface: multilayer formation and stability in surfactant solutions. *Langmuir* 2005;21:9502-9509.
20. Driessens FCM, Heijligers HJM, Borggreven JMPM, Wöltgens JHM: Posteruptive maturation of tooth enamel studied with the electron microprobe. *Caries Res* 1985;19:390-395.
21. Ellingsen JE: Scanning electron microscope and electron microprobe study of reactions of stannous fluoride and stannous chloride with dental enamel. *Scand J Dent Res* 1986;94:299-305.
22. Featherstone JDB, Lussi A: Understanding the chemistry of dental erosion; in Lussi A (ed): *Dental Erosion. Monogr Oral Sci Vol 20*. Basel, Karger, 2006 pp 66-76.
23. Field J, Waterhouse P, German M: Quantifying and qualifying surface changes on dental hard tissues in vitro. *J Dent* 2010;38:182-190.
24. Fujii M, Kitasako Y, Sadr A, Tagami J: Roughness and pH changes of enamel surface induced by soft drinks in vitro-applications of stylus profilometry, focus variation 3D scanning microscopy and micro pH sensor. *Dental materials journal* 2011;30:404.
25. Ganss C: Definition of erosion and links to tooth wear; in Lussi A (ed): *Dental erosion: from diagnosis to therapy. Monogr Oral Sci*. Basel, Karger, 2006 pp 9-16.
26. Ganss C, Klimek J, Starck C: Quantitative analysis of the impact of the organic matrix on the fluoride effect on erosion progression in human dentine using longitudinal microradiography. *Arch Oral Biol* 2004;49:931-935.
27. Ganss C, Lussi A: Diagnosis of erosive tooth wear; in Lussi A (ed): *Dental Erosion: from diagnosis to therapy. Monogr Oral Sci*. Basel, Karger, 2006 pp 32-43.
28. Ganss C, Lussi A, Grunau O, Klimek J, Schlueter N: Conventional and Anti-Erosion Fluoride Toothpastes: Effect on Enamel Erosion and Erosion-Abrasion. *Caries Research* 2011;45:581-589.
29. Ganss C, Neutard L, von Hinckeldey J, Klimek J, Schlueter N: Efficacy of a tin/fluoride rinse: a randomized in situ trial on erosion. *J Dent Res* 2010;89:1214-1218.

30. Ganss C, Schlechtriemen M, Klimek J: Dental erosions in subjects living on a raw food diet. *Caries Res* 1999;33:74-80.
31. Ganss C, Schlueter N, Friedrich D, Klimek J: Efficacy of waiting periods and topical fluoride treatment on toothbrush abrasion of eroded enamel in situ. *Caries Res* 2007a;41:146-151.
32. Ganss C, Schlueter N, Klimek J: Retention of KOH-soluble fluoride on enamel and dentine under erosive conditions--A comparison of in vitro and in situ results. *Arch Oral Biol* 2007b;52:9-14.
33. Ganss C, Schlueter N, Preiss S, Klimek J: Tooth brushing habits in uninstructed adults--frequency, technique, duration and force. *Clin Oral Investig* 2009;13:203-208.
34. Ganss C, von HJ, Tolle A, Schulze K, Klimek J, Schlueter N: Efficacy of the stannous ion and a biopolymer in toothpastes on enamel erosion/abrasion. *J Dent* 2012;40:1036-1043.
35. Grenby TH, Phillips A, Desai T, Mistry M: Laboratory studies of the dental properties of soft drinks. *Br J Nutr* 1989;62:451-464.
36. Guo C, Gemeinhart RA: Understanding the adsorption mechanism of chitosan onto poly (lactide-co-glycolide) particles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2008;70:597-604.
37. Hannig C, Berndt D, Hoth-Hannig W, Hannig M: The effect of acidic beverages on the ultrastructure of the acquired pellicle - An in situ study. *Arch Oral Biol* 2009;54:518-526.
38. Hannig M, Balz M: Influence of in vivo formed salivary pellicle on enamel erosion. *Caries Res* 1999;33:372-379.
39. Hannig M, Balz M: Protective properties of salivary pellicles from two different intraoral sites on enamel erosion. *Caries Res* 2001;35:142-148.
40. Hannig M, Herzog S, Willigeroth SF, Zimehl R: Atomic force microscopy study of salivary pellicles formed on enamel and glass in vivo. *Colloid Polym Sci* 2001;279:479-483.
41. Hannig M, Hess NJ, Hoth-Hannig W, de Vrese M: Influence of salivary pellicle formation time on enamel demineralization--an in situ pilot study. *Clin Oral Invest* 2003;7:158-161.
42. Hannig M, Joiner A: The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monogr Oral Sci* 2006;19:29-64.
43. Hara AT, Gonzalez-Cabezas C, Creeth J, Parmar M, Eckert GJ, Zero DT: Interplay between fluoride and abrasivity of dentifrices on dental erosion-abrasion. *J Dent* 2009;37:781-785.
44. Hara AT, Lippert F, Zero DT: Interplay between experimental dental pellicles and stannous-containing toothpaste on dental erosion-abrasion. *Caries Res* 2013;47:325-329.

45. Harte DB, Manly RS: Four variables affecting magnitude of dentrifice abrasiveness. *Journal of Dental research* 1976;55:322-327.
46. Honnick WD, Zuckerman JJ: Tin (II) hydroxide. *Inorganic Chemistry* 1976;15:3034-3037.
47. Hooper SM, Newcombe RG, Faller R, Eversole S, Addy M, West NX: The protective effects of toothpaste against erosion by orange juice: studies in situ and in vitro. *J Dent* 2007;35:476-481.
48. Hove LH, Young A, Tveit AB: An in vitro study on the effect of TiF(4) treatment against erosion by hydrochloric acid on pellicle-covered enamel. *Caries Res* 2007;41:80-84.
49. Huysmans M, Jager DHJ, Ruben JL, Unk D, Klijn C, Vieira AM: Reduction of Erosive Wear in situ by Stannous Fluoride-Containing Toothpaste. *Caries Research* 2011;45:518-523.
50. Järvinen VK, Rytömaa I, Heinonen OP: Risk factors in dental erosion. *J Dent Res* 1991;70:942-947.
51. Joiner A, Schwarz A, Philpotts CJ, Cox TF, Huber K, Hannig M: The protective nature of pellicle towards toothpaste abrasion on enamel and dentine. *Journal of Dentistry* 2008;36:360-368.
52. Khambe D, Eversole SL, Mills T, Faller RV: Protective effects of SnF2 - Part II. Deposition and retention on pellicle-coated enamel. *Int Dent J* 2014;64 Suppl 1:11-15.
53. Larsen MJ: Chemical events during tooth dissolution. *J Dent Res* 1990;69 Spec No:575-580.
54. Larsen MJ, Nyvad B: Enamel erosion by some soft drinks and orange juices relative to their pH, buffering effect and contents of calcium phosphate. *Caries Res* 1999;33:81-87.
55. Lee HS, Tsai S, Kuo CC, Bassani AW, Pepe-Mooney B, Miksa D, Masters J, Sullivan R, Composto RJ: Chitosan adsorption on hydroxyapatite and its role in preventing acid erosion. *J Colloid Interface Sci* 2012;385:235-243.
56. Liljeborg A, Tellefsen G, Johannsen G: The use of a profilometer for both quantitative and qualitative measurements of toothpaste abrasivity. *International journal of dental hygiene* 2010;8:237-243.
57. Lippert F, Parker DM, Jandt KD: In situ remineralisation of surface softened human enamel studied with AFM nanoindentation. *Surf Sci* 2004;553:105-114.
58. Liu XD, Tokura S, Haruki M, Nishi N, Sakairi N: Surface modification of nonporous glass beads with chitosan and their adsorption property for transition metal ions. *Carbohydrate polymers* 2002;49:103-108.
59. Lussi A, Bossen A, Hoschele C, Beyeler B, Megert B, Meier C, Rakhmatullina E: Effects of enamel abrasion, salivary pellicle, and measurement angle on the optical assessment of dental erosion. *J Biomed Opt* 2012;17:97009-1.

60. Lussi A, Jaeggi T: Erosion—diagnosis and risk factors. *Clin Oral Invest* 2008;12:S5-S13.
61. Lussi A, Jaeggi T, Zero D: The role of diet in the aetiology of dental erosion. *Caries Res* 2004;38 (suppl 1):34-44.
62. Lussi A, Portmann P, Burhop B: Erosion on abraded dental hard tissues by acid lozenges: an in situ study. *Clin Oral Invest* 1997;1:191-194.
63. Lussi A, Schaffner M, Hotz P, Suter P: Dental erosion in a population of Swiss adults. *Community Dent Oral Epidemiol* 1991;19:286-290.
64. Lussi A, Schlueter N, Rakhmatullina E, Ganss C: Dental erosion--an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. *Caries Res* 2011;45:2-12.
65. Maupome G, Diez-de-Bonilla J, Torres-Villasenor G, Andrade-Delgado LC, Castano VM: In vitro quantitative assessment of enamel microhardness after exposure to eroding immersion in a cola drink. *Caries Res* 1998;32:148-153.
66. Meurman JH, Drysdale T, Frank RM: Experimental erosion of dentin. *Scand J Dent Res* 1991;99:457-462.
67. Meurman JH, Frank RM: Progression and surface ultrastructure of in vitro caused erosive lesions in human and bovine enamel. *Caries Res* 1991;25:81-87.
68. Meurman JH, Härkönen M, Näveri H, Koskinen J, Torkko H, Rytömaa I, Järvinen V, Turunen R: Experimental sports drinks with minimal dental erosion effect. *Scand J Dent Res* 1990;98:120-128.
69. Miller S, Truong T, Heu R, Stranick M, Bouchard D, Gaffar A: Recent advances in stannous fluoride technology: antibacterial efficacy and mechanism of action towards hypersensitivity. *International dental journal* 1994;44:83.
70. Muzzarelli RAA, Tubertini O: Chitin and chitosan as chromatographic supports and adsorbents for collection of metal ions from organic and aqueous solutions and sea-water. *Talanta* 1969;16:1571-1577.
71. Nekrashevych Y, Stösser L: Protective influence of experimentally formed salivary pellicle on enamel erosion. An in vitro study. *Caries Res* 2003;37:225-231.
72. Pindborg JJ: Pathology of the dental hard tissues. Copenhagen, Munksgaard, 1970. 1970.
73. Rees JS, Hammadeh M, Jagger DC: Abfraction lesion formation in maxillary incisors, canines and premolars: a finite element study. *European Journal of Oral Sciences* 2003;111:149-154.
74. Ren YF, Amin A, Malmstrom H: Effects of tooth whitening and orange juice on surface properties of dental enamel. *Journal of Dentistry* 2009;37:424-431.
75. Reussner GH, Coccodrilli G, Thiessen R: Effects of phosphates in acid-containing beverages on tooth erosion. *J Dent Res* 1975;54:365-379.

76. Rykke M, Ellingsen JE, Sonju T: Chemical analysis and scanning electron microscopy of acquired pellicle formed in vivo on stannous fluoride treated enamel. *Scand J Dent Res* 1991;99:205-211.
77. Saxegaard E, Rolla G: Fluoride acquisition on and in human enamel during topical application in vitro. *Scand J Dent Res* 1988;96:523-535.
78. Schlueter N, Duran A, Klimek J, Ganss C: Investigation of the effect of various fluoride compounds and preparations thereof on erosive tissue loss in enamel in vitro. *Caries Res* 2009a;43:10-16.
79. Schlueter N, Ganss C, Mueller U, Klimek J: Effect of titanium tetrafluoride and sodium fluoride on erosion progression in enamel and dentine in vitro. *Caries Res* 2007;41:141-145.
80. Schlueter N, Hara A, Shellis RP, Ganss C: Methods for the measurement and characterization of erosion in enamel and dentine. *Caries Res* 2011;45 Suppl 1:13-23.
81. Schlueter N, Hardt M, Lussi A, Engelmann F, Klimek J, Ganss C: Tin-containing fluoride solutions as anti-erosive agents in enamel: an in vitro tin-uptake, tissue-loss, and scanning electron micrograph study. *Eur J Oral Sci* 2009b;117:427-434.
82. Schlueter N, Klimek J, Ganss C: Efficacy of an experimental tin-containing mouth rinse on erosive mineral loss in enamel and dentine in situ. *Caries Res* 2009c;43:415-421.
83. Schlueter N, Klimek J, Ganss C: In vitro efficacy of experimental tin- and fluoride-containing mouth rinses as anti-erosive agents in enamel. *J Dent* 2009d;37:944-948.
84. Schlueter N, Klimek J, Ganss C: Effect of a chitosan additive to a Sn(2+)-containing toothpaste on its anti-erosive/anti-abrasive efficacy-a controlled randomised in situ trial. *Clin Oral Investig* 2013a;1-9.
85. Schlueter N, Klimek J, Ganss C: Randomised in situ Study on the Efficacy of a Tin/Chitosan Toothpaste on Erosive-Abrasive Enamel Loss. *Caries Res* 2013b;47:574-581.
86. Schlueter N, Neutard L, von HJ, Klimek J, Ganss C: Tin and fluoride as anti-erosive agents in enamel and dentine in vitro. *Acta Odontol Scand* 2010;68:180-184.
87. Schweizer-Hirt CM, Schait A, Schmid R, Imfeld T, Lutz F, Muhlemann HR: Erosion und Abrasion des Schmelzes. Eine experimentelle Studie. *Schweiz Monatsschr Zahnheilkd* 1978;88:497-529.
88. Shannon IL: Water-free solutions of stannous fluoride and their incorporation into a gel for topical application. *Caries Research* 1969;3:339.
89. Shellis RP, Ganss C, Ren YF, Zero D, Lussi A: Methodology and models in erosion research: discussion and conclusions. *Caries Res* 2011;45:69-77.
90. Siqueira WL, Custodio W, McDonald EE: New insights into the composition and functions of the acquired enamel pellicle. *J Dent Res* 2012;91:1110-1118.

91. Stenhagen KR, Hove LH, Holme B, Tveit AB: The Effect of Daily Fluoride Mouth Rinsing on Enamel Erosive/Abrasive Wear in situ. *Caries Research* 2013;47:2-8.
92. Svensson O, Thuresson K, Arnebrant T: Interactions between chitosan-modified particles and mucin-coated surfaces. *J Colloid Interface Sci* 2008;325:346-350.
93. Uysal T, Akkurt MD, Amasyali M, Ozcan S, Yagci A, Basak F, Sagdic D: Does a chitosan-containing dentifrice prevent demineralization around orthodontic brackets? *The Angle Orthodontist* 2011;81:319-325.
94. van der Mei HC, Engels E, De Vries J, Dijkstra RJB, Busscher HJ: Chitosan adsorption to salivary pellicles. *Eur J Oral Sci* 2007;115:303-307.
95. Veeregowda DH, van der Mei HC, Busscher HJ, Sharma PK: Influence of fluoride-detergent combinations on the visco-elasticity of adsorbed salivary protein films. *Eur J Oral Sci* 2011;119:21-26.
96. Vukosavljevic D, Custodio W, Buzalaf MA, Hara AT, Siqueira WL: Acquired pellicle as a modulator for dental erosion. *Arch Oral Biol* 2014;59:631-638.
97. Wegehaupt FJ, Schneiders V, Wiegand A, Schmidlin PR, Attin T: Influence of two different fluoride compounds and an in vitro pellicle on the amount of KOH-soluble fluoride and its retention after toothbrushing. *Acta Odontol Scand* 2009;67:355-359.
98. Wei SH, Forbes WC: Electron microprobe investigations of stannous fluoride reactions with enamel surfaces. *J Dent Res* 1974;53:51-56.
99. West NX, Hughes JA, Addy M: The effect of pH on the erosion of dentine and enamel by dietary acids in vitro. *J Oral Rehab* 2001;28:860-864.
100. Wiegand A, Attin T: Occupational dental erosion from exposure to acids: a review. *Occup Med (Lond)* 2007;57:169-176.
101. Wiegand A, Attin T: Design of erosion/abrasion studies--insights and rational concepts. *Caries Res* 2011;45 Suppl 1:53-59.
102. Wiegand A, Schwerzmann M, Sener B, Carolina Magalhaes A, Roos M, Ziebolz D, Imfeld T, Attin T: Impact of toothpaste slurry abrasivity and toothbrush filament stiffness on abrasion of eroded enamel-an in vitro study. *Acta Odontologica* 2008;66:231-235.
103. Wiegand A, Waldheim E, Sener B, Magalhaes AC, Attin T: Comparison of the effects of TiF4 and NaF solutions at pH 1.2 and 3.5 on enamel erosion in vitro. *Caries Res* 2009;43:269-277.
104. Yin A, Margolis HC, Yao Y, Grogan J, Oppenheim FG: Multi-component adsorption model for pellicle formation: the influence of salivary proteins and non-salivary phospho proteins on the binding of histatin 5 onto hydroxyapatite. *Archives of oral biology* 2006;51:102-110.
105. Young A, Smistad G, Karlsen J, Rolla G, Rykke M: Zeta potentials of human enamel and hydroxyapatite as measured by the Coulter DELSA 440. *Adv Dent Res* 1997;11:560-565.

106. Young A, Thrane PS, Saxegaard E, Jonski G, Rølla G: Effect of stannous fluoride toothpaste on erosion-like lesions: an in vivo study. *Eur J Oral Sci* 2006;114:180-183.
107. Yu H, Attin T, Wiegand A, Buchalla W: Effects of various fluoride solutions on enamel erosion in vitro. *Caries Res* 2010;44:390-401.



## **Erklärung zur Dissertation**

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

Ich bedanke mich bei Frau Prof. Dr. N. Schlüter für die jederzeit freundliche und hilfsbereite Beratung und Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit.

Mein weiterer Dank gilt Frau Prof. Dr. C. Ganss für wertvolle Anregungen und Beratung.

Frau B. Meier danke ich für die Betreuung und Hilfe bei den labortechnischen Arbeiten.

Ich bedanke mich bei meiner Mutter und meinen Brüdern für Motivation, Ratschläge und technische Unterstützung.

Besonders bedanke ich mich bei meinem Mann für die Unterstützung und Motivation während des Studiums und bei der Anfertigung dieser Arbeit.